

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARIA FERNANDA PIRES DE CAMARGO

**Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá
(*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e
avaliação da atividade antiinflamatória tópica.**

Ribeirão Preto
2008

MARIA FERNANDA PIRES DE CAMARGO

**Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá
(*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e
avaliação da atividade antiinflamatória tópica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Mestre em Medicamentos e
Cosméticos.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves 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.

FICHA CATALOGRÁFICA

CAMARGO, Maria Fernanda Pires de

Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. Ribeirão Preto, 2008.

99 p. : 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. Óleo de maracujá.
3. Óleo essencial de lavanda.
4. Distribuição granulométrica.
5. Estabilidade.
6. Avaliação da atividade antiinflamatória tópica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Fernanda Pires de Camargo

Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica.

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Medicamentos e Cosméticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Pedro Alves da Rocha Filho

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, **Ana Maria** e **Rubens Tadeu** que são meus exemplos de persistência, dedicação e superação. A confiança, otimismo, apoio, amizade e amor incondicional que sempre demonstraram por mim me motivaram a realizar essa conquista. Dedico este trabalho a vocês, que são meus verdadeiros MESTRES!

Agradecimentos

A **Deus** pela proteção e paz interior que me encorajaram nos momentos difíceis!

Aos **meus pais, minha família e amigos** por todo apoio e confiança em mim depositadas, fazendo com que eu sempre me sentisse próxima e que acreditasse que “ausência não significa esquecimento”.

Ao meu querido amigo e orientador **Prof. Dr. Pedro** pela orientação durante a realização deste trabalho, por abrir as portas do laboratório Kosmos, possibilitando que eu conhecesse o mundo da pesquisa. Obrigada pela atenção e agradável convivência. Obrigada pela oportunidade de realizar o estágio PAE sob sua orientação. Seus ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Àqueles que não foram apenas colegas de laboratório, mas amigos fora e dentro da Universidade de São Paulo: **Mônica, Gabriela, Mateus e Cíntia!!** Obrigada pela atenção, conselhos e sincera amizade! **Fernanda** e **Bianca**: foi muito bom compartilhar todas as etapas do mestrado com vocês.. as angústias da qualificação e agora a alegria da defesa! Obrigada por todo apoio e companheirismo. **Jacque**, muito obrigada pela amizade e pela atenção em me ajudar sempre!! Sua contribuição foi indispensável para o meu crescimento profissional! Ao **Kauê**, agradeço imensamente pela amizade e pelo grande apoio durante minha instalação em Ribeirão Preto. Obrigada por me ajudar a estudar para a prova do mestrado durante as nossas “caminhadas científicas”, me ensinar a fazer pôster, além dos inúmeros momentos divertidos que passamos juntos! Com o seu apoio tudo foi mais fácil!

Ao **Orlando** que sempre esteve disposto a me ajudar, mesmo quando já não estava no laboratório Kosmos, por ter me orientado durante o estágio e pela oportunidade de ser sua parceira na realização de trabalhos! Muito obrigada pela amizade e pela valiosa contribuição!

À **Raquel, Anne, Gustavo e Ana Paula** pela amizade e agradável convivência no laboratório.

À **Júnia** pela amizade sincera e companheirismo quando Ribeirão Preto ainda nos era desconhecida. Obrigada por todos os momentos que dividimos!

A vocês, agradeço pela amizade, discussões científicas e pelos incontáveis momentos divertidos regados a cafezinhos.. Sem vocês tudo seria muito mais difícil!

À **Anna Paula** pela amizade verdadeira, longas conversas e diversão que dividimos durante esse tempo!

À **Yris** e à **Lílian** pela grande amizade que construímos no tempo em que moramos juntas! Obrigada por terem sido companheiras e pelos inúmeros momentos de diversão!

Ao **Paly** pelo incentivo e valorização deste trabalho.

Ao meu amigo **Vínicus** pelo incentivo na realização deste trabalho!

Ao técnico **Eduardo (Dú)** pela disponibilidade em ajudar e pelos diversos momentos de descontração!

Aos técnicos **Jabor, Toninho e Henrique Diniz** por me auxiliarem na realização dos meus experimentos.

Aos funcionários do biotério da FCFRP, **Cris e Reinaldo!**

À técnica **Izabel Cristina** da Química Orgânica pela contribuição nos meus experimentos e pela disponibilidade e atenção com que sempre me atendeu.

À **Prof^a. Dr^a. Maria José** do laboratório de Controle de Qualidade por gentilmente permitir que eu realizasse parte dos meus experimentos em seu

laboratório, pela doação dos animais experimentais e pela oportunidade de realizar o estágio PAE na disciplina “Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos”.

Ao **Prof. Dr. Jairo** do laboratório de Farmacognosia por permitir que eu utilizasse o seu laboratório para a realização dos meus experimentos e aos seus alunos pela atenção!

À **Prof^a. Dr^a. Patrícia** do laboratório de Bioengenharia Cutânea pela doação dos animais experimentais.

À **Ana, Carlos, Eleni e Rosana** pela atenção sempre que precisei da seção de Pós Graduação.

À **Comissão de Pesquisa da FCFRP** pela oportunidade de fazer parte desta.

A todos os **funcionários e professores** da Universidade de São Paulo que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos amigos do **teatro TRUSP** pelos prazerosos momentos que me abasteceram com a energia necessária para realizar este trabalho e por aprendizados que servirão por toda a vida.

A **CAPES** pelo auxílio financeiro.

Às empresas **Bio Essência[®], Beraca Sabará[®] e Oxiteno[®]** pela doação das matérias-primas necessárias para a realização deste trabalho.

“Só os que ousam errar muito podem realizar muito”
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1-INTRODUÇÃO	2
2-REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1-Pele.....	6
2.2-Nanotecnologia em cosméticos.....	9
2.3-Emulsões	9
2.4-Nanoemulsões	11
2.5-Vantagens das nanoemulsões para aplicação cosmética.....	11
2.6-Métodos de obtenção	12
2.7-Estabilidade.....	15
2.8-Óleos essenciais	17
2.8.1-Óleo essencial de lavanda	18
2.9-Óleo de maracujá	20
3-OBJETIVOS	23
3.1-Objetivos específicos	23
4-MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1-Material	25
4.1.1-Fase oleosa	25
4.1.2-Fase aquosa	25
4.1.3-Ativo	25
4.1.4-Tensoativos	26

4.1.5-Antioxidante.....	26
4.1.6-Silicones.....	27
4.1.7-Tampão Mcvallaine (Na ₂ HPO ₄ / ácido cítrico).....	28
4.2-Métodos	28
4.2.1-Preparo das emulsões.....	28
4.2.1.1-Emulsificação por método do EPI utilizando aquecimento.....	29
4.2.1.2-Emulsificação a frio pelo método do EPI	29
4.2.2-Determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá.....	29
4.2.3-Determinação do sistema tensoativo.....	30
4.2.4-Influência da adição do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido pelo sistema.....	31
4.2.5-Obtenção das nanoemulsões	31
4.2.6-Influência das variáveis do processo de obtenção das nanoemulsões	32
4.2.6.1-Influência da quantidade de tensoativo.....	32
4.2.6.2-Influência da adição de co-tensoativos	33
4.2.6.3-Influência da adição de eletrólitos	33
4.2.6.4-Influência da adição de silicones	34
4.2.6.5-Determinação do Ponto de Turvação (Cloud Point) do tensoativo hidrofílico	34
4.2.6.6-Determinação da temperatura de inversão de fases	34
4.2.7-Characterização físico-química das formulações	35
4.2.7.1-Determinação da distribuição granulométrica e do potencial zeta.....	35
4.2.7.2-Determinação do valor de pH.....	36
4.2.7.3- Determinação da condutividade elétrica.....	36
4.2.8-Avaliação da estabilidade preliminar	36
4.2.8.1-Avaliação macroscópica	36

4.2.8.2-Avaliação microscópica	37
4.2.8.3-Centrifugação	37
4.2.8.4-Estresse Térmico	37
4.2.9-Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	37
4.2.10-Extração do óleo essencial de lavanda em nanoemulsões após o TEA e avaliação dos seus constituintes por CG/MS	38
4.2.11- Avaliação da atividade antiinflamatória tópica das nanoemulsões	40
4.2.11.1-Animais experimentais	40
4.2.11.2-Sistema e fonte de irradiação UV	40
4.2.11.3-Medida da irradiância da lâmpada UV e cálculo do tempo de exposição	41
4.2.11.4-Tratamento dos animais	41
4.2.11.5-Sistema Chroma Meter Minolta	42
4.2.12-Análise Estatística	42
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1-Determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá	44
5.2-Determinação do sistema tensoativo	44
5.3-Influência da adição do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido para o sistema	46
5.4-Obtenção das nanoemulsões	47
5.5-Avaliação da estabilidade preliminar	50
5.6-Testes de estabilidade acelerada (TEA)	56
5.7-Avaliação dos constituintes do óleo essencial de lavanda nas nanoemulsões após TEA por CG/MS	63
5.8-Determinação do Ponto de Turvação (Cloud Point) do tensoativo hidrofílico	66
5.9-Determinação da temperatura de inversão de fases (PIT)	66
5.10-Influência das variáveis do processo de obtenção de nanoemulsões	69

5.10.1-Influência da quantidade de tensoativo.....	69
5.10.2-Influência da velocidade de agitação	70
5.10.3-Influência da adição de eletrólitos	72
5.10.4-Influência da adição de silicones	74
5.11-Avaliação da atividade antiinflamatória tópica das nanoemulsões	76
5.11.1-Medida da irradiância da lâmpada UV e cálculo do tempo de exposição	76
5.11.2-Avaliação do potencial antiinflamatório	77
6. CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICES.....	97
ANEXO	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes majoritários de diversas espécies de lavanda.....	19
Tabela 2 - Concentração de tensoativos lipofílico e hidrofílico utilizados na determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá.....	30
Tabela 3 - Denominação e composição (p/p) das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.....	30
Tabela 4 - Composição das formulações para a avaliação da influência do óleo essencial no EHL do sistema.....	31
Tabela 5 - Composição das formulações contendo óleos de maracujá e lavanda como fase oleosa.....	32
Tabela 6 - Composição das formulações contendo óleo de maracujá como fase oleosa.....	32
Tabela 7 - Composição das formulações manipuladas para análise da influência da quantidade de tensoativo.....	33
Tabela 8 - Composição das formulações adicionadas de silicones.....	34
Tabela 9 - Análise macroscópica e microscópica das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.....	45
Tabela 10 - Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.....	45
Tabela 11 - Análise macroscópica das formulações manipuladas para a avaliação da influência do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido para o sistema.....	47
Tabela 12 - Análise macro e microscópica das formulações contendo óleo de maracujá.....	48
Tabela 13 - Análise macro e microscópica das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda.....	48
Tabela 14 - Análise macroscópica das formulações contendo óleo de maracujá após centrifugação e estresse térmico.....	51
Tabela 15 - Análise macroscópica das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda após centrifugação e estresse térmico.....	52
Tabela 16 - Distribuição granulométrica das formulações estáveis após centrifugação e estresse térmico.....	53

Tabela 17 - Valor de condutividade elétrica e de pH das formulações contendo óleo de maracujá em 48h do preparo e após estresse térmico.....	54
Tabela 18 - Valor de condutividade elétrica e de pH das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda em 48h do preparo e após estresse térmico...	54
Tabela 19 - Porcentagem dos componentes encontrados no óleo essencial de lavanda antes de ser veiculado em nanoemulsões (1º dia) e após ser extraído de nanoemulsões submetidas à geladeira ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e estufa ($45\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 60 dias.....	64
Tabela 20 - Índice de Kovat's obtido, Índice de Kovat's encontrado na literatura e Índice de Similaridade dos compostos majoritários do óleo de lavanda.....	64
Tabela 21 - Valores de pH de F1, F2 e F5 quando submetidas a diferentes temperaturas por 1, 7 e 30 dias.....	72
Tabela 22 - Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico.....	73
Tabela 23 - Análise macroscópica das formulações adicionadas de silicones após centrifugação e estresse térmico.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pele e anexos	6
Figura 2 - Sumidades floridas da lavanda	18
Figura 3 - Fruto do maracujá.....	21
Figura 4 – Clevenger	38
Figura 5 - Compartimento de madeira contendo fonte de luz UVB utilizado nos experimentos de indução da inflamação cutânea em camundongos sem pêlo.....	41
Figura 6 - Fotomicrografias das emulsões obtidas com óleo de maracujá ou com a associação dos óleos de maracujá e de lavanda após 24h do preparo (aumento de 400x).....	49
Figura 7 - Valor de condutividade elétrica (mS/cm) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias	57
Figura 8 - Valor de pH apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias	58
Figura 9 - Valor de potencial zeta (em módulo) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias.....	59
Figura 10 - Tamanho de glóbulos (nm) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias	60
Figura 11 - Parte do Cromatograma realizado para o óleo de lavanda (1° dia e após 60 dias a 25±2°C, 4±2°C e 45±2°C)	65
Figura 12 - Valor de condutividade elétrica versus temperatura (°C) das formulações M6, M7, M10, F1, F2 e F5.....	67
Figura 13 - Tamanho de glóbulos (nm) das emulsões F1, F2 e F5 com diferentes quantidades de tensoativos em 24 horas do preparo (1dia) e 30 dias.....	69
Figura 14 - Distribuição granulométrica das emulsões F1, F2 e F5 após serem submetidas a 600, 8.000 e 9.500 rpm durante 5 minutos	71
Figura 15 - Distribuição granulométrica das emulsões F1, F2 e F5 adicionadas dos silicones 245 Fluid® e 190 Fluid®.....	76
Figura 16 - Diferença no valor de (a) obtida dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2), grupo 3 (G3), grupo 4 (G4)	77
Figura 17 - Valores de (a) apresentado pelos animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 antes da irradiação e após 2, 5, 10, 24, 48, 72 horas da irradiação.....	78

RESUMO

RESUMO

CAMARGO, M. F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A nanotecnologia é um fenômeno que se aplica a praticamente todos os setores da ciência, sendo que na área cosmética o elevado investimento neste campo tem reforçado a idéia de que produtos nanotecnológicos proporcionam vantagens reais aos consumidores. A crescente exigência do consumidor e os avanços no conhecimento sobre obtenção e estabilidade dos sistemas dispersos viabilizam o desenvolvimento de veículos diferenciados como, por exemplo, nanoemulsões, que além da inerente estabilidade, apresentam aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, além de poderem facilitar a penetração de ativos. Existem dois métodos de obtenção de nanoemulsões: os que empregam baixa ou alta energia de emulsificação. O uso de óleos vegetais em produtos cosméticos tem sido intensamente valorizado, baseando-se no conceito de que são seguros e biocompatíveis. O óleo de maracujá é extensamente empregado em formulações cosméticas e o óleo essencial de lavanda é citado na literatura pelo efeito cicatrizante e antiinflamatório, dentre outros. Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver nanoemulsões à base de óleo de maracujá e óleo essencial de lavanda nas concentrações de 1,0, 2,0 e 5,0%, a partir de método a frio de baixa energia de emulsificação, bem como avaliar a influência da adição de outros componentes e dos parâmetros relacionados ao método de obtenção na estabilidade e tamanho de glóbulos das nanoemulsões e posteriormente avaliar a atividade antiinflamatória tópica da emulsão contendo 5,0% do óleo essencial em camundongos sem pêlo. Os resultados demonstraram que a adição do óleo essencial de lavanda no sistema provocou redução no tamanho de glóbulos e aumento da estabilidade física e que o método de emulsificação a frio foi eficaz na formação de nanoemulsões estáveis. O valor de EHL, o par de tensoativos, a proporção entre as fases aquosa/ oleosa e tensoativa, bem como a adição de silicones e eletrólitos e a velocidade de agitação influenciam sobremaneira as características e a estabilidade das dispersões obtidas. No estudo de estabilidade acelerada, observou-se a alteração significativa dos valores de pH e condutividade elétrica, o que possivelmente é decorrente da hidrólise de compostos presentes no óleo essencial. Os valores de potencial zeta e tamanho de glóbulos não demonstraram alteração relevante em 30 dias de estabilidade acelerada. Na avaliação *in vivo*, a nanoemulsão adicionada de 5,0% do óleo essencial de lavanda apresentou resultados significativos quando comparado aos demais grupos, o que sugere boa perspectiva na utilização tópica do óleo essencial de lavanda, sendo este merecedor de estudos complementares para a elucidação dos mecanismos antiinflamatórios envolvidos, dos componentes fito-químicos responsáveis por esta ação e da concentração a ser utilizada.

Palavras-chave: nanoemulsão, óleo de maracujá, óleo essencial de lavanda, estabilidade, distribuição granulométrica, atividade antiinflamatória tópica.

ABSTRACT

ABSTRACT

CAMARGO, M. F. P. **Development of nanoemulsions containing passion fruit seed oil (*Passiflora edulis*) and lavender essential oil (*Lavandula officinalis*) and evaluation of its topical anti-inflammatory activity.** 2008. 99 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Nanotechnology is a phenomenon that applies to mainly all sectors of science and in the cosmetics area the high investment in this field has strengthened the idea that nanotechnology products offer real advantages to consumers. The growing demand of consumers and the advances in knowledge about production and stability of dispersed systems enable the development of differentiated vehicles such as nanoemulsions, which besides the inherent stability, have pleasant sensory aspect, high spread ability and hydration power, in addition they can facilitate the penetration of actives. There are two methods of obtaining nanoemulsions: those that employ low or high energy of emulsification. The use of vegetable oils in cosmetics has been intensely valued, based on the concept that is safe and biocompatible. Passion fruit oil is widely used in cosmetic formulations and lavender essential oil is reported in the literature for healing and anti-inflammatory effects, among others. The aim of this study was to develop nanoemulsion based in passion fruit oil and lavender essential oil in the concentrations of 1.0, 2.0 and 5.0%, from low-energy method of emulsification, not employing heating, and evaluate the influence of the addition of other materials and parameters related to the production method in the system stability and droplets size of nanoemulsions and then evaluate the anti-inflammatory activity of topical nanoemulsion containing 5.0% of lavender essential oil in hairless mice. The results demonstrated that the addition of lavender essential oil in the system caused reduction in the droplets size and increasing in the physical stability and that the method of emulsification used was effective in the formation of stable nanoemulsions. The HLB value, the pair of surfactants, the ratio between aqueous/oily and surfactant phase, the addition of silicones and electrolytes and speed of agitation particularly affect the characteristics and stability of the obtained dispersions. In the accelerated stability tests, there was a significant change in the pH and electrical conductivity values, which is possibly resulting from the hydrolysis of compounds present in the essential oil. The values of zeta potential and droplets size showed no relevant change in 30 days of accelerated stability. In the *in vivo* evaluation, the nanoemulsion added of 5.0% of the lavender essential oil showed significant results when compared to the other groups, which suggests good perspective on topical use of this oil, which is worthy of further studies to the elucidation of the anti-inflammatory mechanisms involved, the phyto-chemical components responsible for this action and the concentration of use.

Keywords: nanoemulsion, passion fruit oil, lavender essential oil, stability, size distribution, topical anti-inflammatory activity.

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais os formuladores de produtos cosméticos têm sido desafiados a desenvolver formulações tópicas eficazes e diferenciadas.

As emulsões são amplamente empregadas como veículos nas indústrias cosmética e farmacêutica por apresentarem vantagens como a veiculação de fármacos ou ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam.

Os avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos na obtenção e estabilidade dos sistemas dispersos, bem como o emprego de novas tecnologias, viabilizam o desenvolvimento de sistemas emulsionados diferenciados (MARTI-MESTRES, NIELLOUD, 2002) como nanoemulsões, emulsões múltiplas, emulsões com cristal líquido e microemulsões.

As nanoemulsões mostram-se promissoras na ciência cosmética devido à estabilidade, ao grande poder de hidratação e por proporcionar sensorial agradável (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUM, SIMONNET, ALLORET, 2004). Além disso, apresentam alta espalhabilidade (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-ABRUM, SIMONNET, ALLORET, 2004), o que proporciona a formação de uma película mais uniforme sobre a pele quando comparadas às emulsões clássicas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de alta ou baixa energia de emulsificação (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004). Os métodos que utilizam alta energia de emulsificação são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento e permitem melhor controle da granulometria e ampla escolha dos constituintes da formulação (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; LIU *et al.*,

2006). Contudo estes equipamentos demandam alto investimento inicial, o que pode tornar a viabilidade comercial limitada.

Os métodos de baixa energia de emulsificação se utilizam das propriedades físico-químicas do sistema para a obtenção de emulsões com glóbulos de tamanho reduzido (SHINODA, SAITO, 1969; TADROS et al. 2004; ÚSON, GARCIA, SOLANS, 2004). Para que a produção de nanoemulsões por estes métodos se torne economicamente viável, portanto, faz-se necessário o estudo dos fenômenos físico-químicos envolvidos no processo de obtenção.

O desenvolvimento de emulsões utilizando óleos vegetais têm sido intensamente valorizado, devido às atividades benéficas que a complexa composição de ácidos graxos presentes nestes óleos pode exercer na pele e pelo conceito de que são seguros e biocompatíveis, fatores que reforçam a atual tendência de utilização de produtos naturais (BLOISE, 2003).

O óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) é extensamente empregado pela indústria cosmética, sendo que um de seus apelos mercadológicos é a alta porcentagem de ácido linoléico, normalmente encontrado na pele humana (GONÇALVES, 2000).

O óleo essencial de lavanda apresenta, segundo a literatura, atividade antiinflamatória e cicatrizante, além de baixa toxicidade à pele, podendo ser utilizado como componente ativo em produtos que se destinem a reduzir pequenos processos inflamatórios cutâneos como: picadas de insetos, queimaduras solares, etc (CAVANAGH, WILKINSON, 2002).

Nesta pesquisa, foram desenvolvidas nanoemulsões por métodos de baixa energia, contendo óleo de maracujá (*Passiflora edulis*), adicionadas ou não de óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*). As formulações foram caracterizadas e avaliadas quanto à estabilidade física, bem como a composição dos constituintes majoritários presentes no óleo essencial de lavanda foram determinados, antes e após os testes de estabilidade acelerada. Adicionalmente foi estudada a

influência de variáveis na composição das nanoemulsões obtidas e de variáveis do processo de obtenção quanto à distribuição granulométrica e estabilidade do sistema. A atividade antiinflamatória tópica do óleo essencial de lavanda puro ou veiculado em nanoemulsão na concentração de 5,0% foi estudada em camundongos sem pêlo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

O sucesso do desenvolvimento de formulações requer não somente o desenvolvimento de veículos estáveis e com características diferenciadas, mas também a otimização da atividade do ativo em sua liberação para o sítio alvo (PAGLIARA *et al.*, 1999).

A principal função da pele é separar e proteger o interior do corpo do ambiente externo, além de receber estímulo sensorial, ajudar a regular a temperatura do corpo e excretar substâncias não desejadas. A pele também previne a entrada de microrganismos, substâncias químicas e várias formas de radiação, além de proteger os fluidos e tecidos corporais (BARRY, 2002).

Estruturalmente a pele possui uma série de camadas, há três grandes divisões: epiderme (estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme (Figura 1).

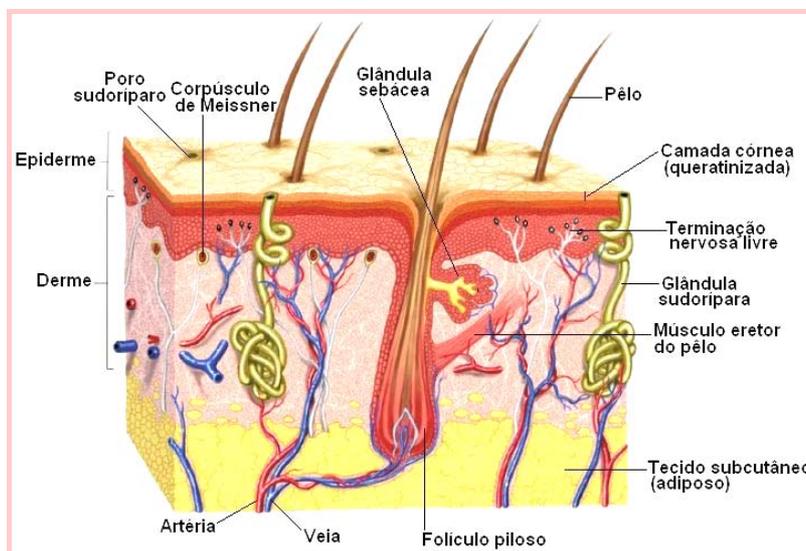


Figura 1 - Pele e anexos. Reproduzida de: < <http://www.afh.bio.br>>

O estrato córneo funciona como uma proteção física e barreira química. É formado por uma camada compacta de células (corneócitos) alongadas, mortas e desidratadas, que são o produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável. Dentro dos corneócitos são encontradas

substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular, como aminoácidos e açúcares e, a queratina, que fornece resistência a estas células. Entre estes corneócitos está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídios neutros (ZATZ, 1993; BOUWSTRA *et al.*, 2003).

O estrato córneo pode ser descrito como uma “parede de tijolos”, onde as células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica, organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45-50 %), colesterol (25 %), ácidos graxos (10-15 %) e lipídios (5 %) (MADISON, 2003).

Abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, que é enzimaticamente ativa e formada por células em vários estágios de diferenciação bioquímica. Na epiderme há um constante movimento das células recém formadas partindo da camada basal em direção ao estrato córneo, sendo que a taxa de renovação celular é igual à taxa de desprendimento das células mais externas do estrato córneo. Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas são estruturalmente parte da epiderme, porém neste tecido não existem vasos sanguíneos, e os nutrientes precisam se difundir partindo da derme (ZATZ, 1993; BARRY, 2002; SMITH, MALBACH, SURBER, 2000; BOUWSTRA *et al.*, 2003).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. A derme é responsável pela maioria da força mecânica e das sensações da pele. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Sob a pele, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como isolante térmico, reserva energética e na proteção contra choques mecânicos (ZATZ, 1993; BARRY, 2002; SMITH, MALBACH, SURBER, 2000).

Na inflamação cutânea há uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos adjacentes, sempre que há lesão ou destruição celular. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados não só por agentes infecciosos, como também por agentes físicos (radiação, queimadura, trauma), químicos (substâncias cáusticas) isquemia e interações antígeno-anticorpo (BARRY, 2002; CARVALHO, 2004).

A resposta inflamatória apresenta uma série complexa de adaptações teciduais que envolvem principalmente os vasos sanguíneos, os componentes líquido e celular do sangue e o tecido conjuntivo adjacente, tendo como objetivo a destruição, diluição ou encarceramento do agente agressor e das células que este lesou, seguida de uma série de eventos que visam cicatrizar ou reconstituir o tecido lesado e gerar imunidade sistêmica (CARVALHO, 2004).

Os sinais cardinais da inflamação são: calor, rubor, dor e tumor e são conseqüentes ao efeito local induzido por mediadores do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e liberação de agentes indutores da dor (MATSUMURA, ANANTHASWAMY, 2004; CARVALHO, 2004). O efeito agudo mais pronunciado da radiação UV em pele humana é o eritema, escurecimento da pele pela produção de melalina e imunossupressão local ou sistêmica (MATSUMURA, ANANTHASWAMY, 2004).

Existem diversos mecanismos de ação para fitofármacos antiinflamatórios. Estudos demonstram que os compostos fenólicos eugenol, timol, carvanol podem agir como análogos estruturais dos derivados salicílicos, sendo seu mecanismo antiinflamatório provável a inibição da ciclooxigenase (CARVALHO, 2004).

Já os triterpenos, esteróides e sesquiterpenos podem intervir no mecanismo da reação imunológica. O mecanismo de ação destes compostos na inflamação ainda não está completamente elucidado, mas estudos indicam que seria por inibição do sistema complemento (CARVALHO, 2004).

2.2 Nanotecnologia em Cosméticos

A nanotecnologia é um raro fenômeno na história recente que se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, da engenharia de materiais e processos e de mercado. A habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nanométrica está promovendo uma revolução científica e tecnológica de proporções ainda não identificadas (LEE, 2004).

Na área farmacêutica, os sistemas nanométricos ainda não são amplamente caracterizados como as emulsões clássicas, suspensões e lipossomas, porém possuem grande potencial de serem utilizados como sistemas sofisticados de liberação de drogas (LEE, 2004).

Na área cosmética o crescente investimento em produtos baseados em nanotecnologia demonstra ser de grande aplicação para sistemas dispersos.

Segundo a Nanobiotec, organização nacional voltada para a área de nanobiotecnologia, no período de 1990 a 2005 houve mais de 500 publicações sobre o uso de nanotecnologia para desenvolvimento de produtos dermocosméticos. Foram também registradas 312 patentes no mundo relativas a produtos cosméticos ou dermatológicos entre 1966 e 2005 (GUTERRES, PASA, PIMENTA, 2006). Empresas internacionais renomadas como a L'oreal, Lancôme, Anna Pegova, Procter & Gamble e Christian Dior, além das pioneiras no mercado brasileiro Natura e O Boticário lançaram produtos baseados em nanotecnologia no mercado. Estes produtos prometem maior hidratação, maior penetração de ativos que se destinam a agir na derme como, por exemplo, compostos que promovem aumento da sínteses de colágeno e elastina (produtos anti-idade), bem como melhora no aspecto sensorial de diversos produtos para a pele, incluindo filtros solares.

2.3 Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos e termodinamicamente instáveis que consistem em pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso em outro na forma de glóbulos

(BECHER, SCHICK, 1987; FRIGBERG, 1988; SILVA, SOARES, 1996; BROOKS, 1998; HOLMBERG, 2002). Normalmente, não se formam espontaneamente (exceto em microemulsões) e suas propriedades dependem não apenas de condições termodinâmicas como também do método de preparação, das características e ordem de adição de cada componente (LIN, KURIHARA e OTHA, 1975).

Em geral, as emulsões são compostas por três fases: aquosa, oleosa e emulsificante (BECKER, SCHICK, 1987; PINHO STORPIRTIS, 1998; MORRISON, ROSS, 2002).

As emulsões simples são classificadas em: água em óleo (A/O), quando os glóbulos da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa, ou óleo em água (O/A), quando os glóbulos da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa (BECHER, 1965; GOPAL, 1969; TADROS, BECKER, 1983; MORRISON, ROSS, 2002).

As emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela adição de agentes tensoativos capazes de diminuir a tensão interfacial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna (JEONG, OH, KIM, 2001; HOLMBERG, 2002; MORRISON, ROSS, 2002; CAPEK, 2004).

Os tensoativos são moléculas anfifílicas que se adsorvem na interface entre a fase dispersa e dispersante durante o processo de emulsificação e podem prontamente prevenir fenômenos como floculação e coalescência (BROOKS, 1998).

Foram classificados numericamente por Griffin na metodologia conhecida por sistema Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) segundo suas características de hidrofília e lipofília, sendo que foram lhes atribuindo valores de 1,0 a 50,0, sendo que quanto mais elevado o valor, maior é a sua hidrofílicidade. A aplicação de cada tensoativo está relacionada com o valor de seu EHL, sendo que os que apresentam baixo EHL são indicados para emulsões água em óleo (A/O) e aqueles com valores intermediários são recomendados para sistemas óleo em água (O/A) (GRIFFIN, 1967; SCHICK, 1987; MORRISON, ROSS, 2002).

2.4 Nanoemulsões

Nanoemulsões são constituídas por glóbulos entre 20 a 500 nm, ou seja, com distribuição granulométrica entre microemulsões e macroemulsões ou emulsões clássicas (FORGIARINI *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200nm, ou leitosa quando o tamanho é de 200 a 500 nm (CAPEK, 2004).

Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis as nanoemulsões são cineticamente estáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. Não requerem altas concentrações de tensoativos (entre 3,0 a 10%) comparado às microemulsões na qual a concentração destes pode chegar a 20% (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

A inerente estabilidade das nanoemulsões está relacionada ao emprego de tensoativos não-iônicos e/ou polímeros que conferem estabilização estérica entre os glóbulos, reduzindo a possibilidade de coalescência, bem como pela superação da força da gravidade atuante nesses glóbulos pelo movimento browniano presente nesses sistemas, evitando assim processos de instabilidade (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

A granulometria do sistema também previne o fenômeno da coalescência, pois esses glóbulos não são facilmente deformáveis. A grande espessura do filme interfacial, relativo ao tamanho do glóbulo, previne que a diminuição natural deste filme seja suficiente para causar o rompimento do glóbulo (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2001; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006a).

2.5 Vantagens das nanoemulsões para aplicação cosmética

Além da maior estabilidade das nanoemulsões quando comparadas às emulsões clássicas, existem outras características que justificam a sua aplicação em produtos cosméticos:

- a baixa tensão interfacial promove maior espalhabilidade da formulação e facilita a penetração dos glóbulos através das rugosidades da pele, possibilitando maior capacidade de hidratação além de facilitar a penetração de ativos (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2004).

- a fluidez do sistema e o diminuto tamanho dos glóbulos proporcionam uma distribuição uniforme do produto sobre a pele (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

- a fluidez natural do sistema (em baixas concentrações de fase oleosa) confere às nanoemulsões aspecto sensorial muito valorizado em produtos cosméticos (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2004).

- as nanoemulsões podem ser alternativas a 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).

- podem ser utilizadas como sistema de veiculação de fragrâncias ou ainda para fabricação de perfumes sem álcool (TADROS *et al.*, 2004; BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

- podem ser esterilizadas por filtração sem que o procedimento cause alteração de suas propriedades (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2004).

2.6 Métodos de Obtenção

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

Os métodos que utilizam alta energia de emulsificação são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores, ou pela utilização de ultra-som (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.* 2004; LIU *et al.*, 2006). A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de

deformar e quebrar as gotículas da fase interna em glóbulos menores pela superação da pressão de Laplace (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Estas técnicas permitem melhor controle da granulometria e ampla escolha dos constituintes da formulação (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2004).

Fatores como temperatura, viscosidade e concentração da fase interna influenciam as características físico-químicas do produto final. A otimização das condições operacionais deve ser realizada para cada sistema desenvolvido e tipo de equipamento utilizado (BENITA, LEVY, 1993; TADROS *et al.*, 2004). Contudo estes equipamentos demandam alto investimento inicial, o que pode tornar a viabilidade comercial limitada.

Os métodos de emulsificação por baixa energia 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 (SHINODA, SAITO, 1968; ÚSON, GRACIA, SOLANS, 2004; SAJJADI, 2006).

Existem dois métodos de inversão de baixa energia: transicional conhecida também como método de inversão de fases pela temperatura (Phase Inversion Temperature = PIT) e emulsificação por inversão de fases pela alteração da fração volumétrica (Emulsion Phase Inversion = EPI) (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

Para os tensoativos não iônicos polietoxilados a inversão transicional pode ser atingida pela mudança na temperatura do sistema favorecendo uma transição da emulsão A/O em valores elevados de temperatura para uma emulsão O/A em baixas temperaturas (SHINODA, SAITO, 1968; FERNANDEZ *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2004).

Durante o aquecimento, os grupos de óxido de etileno, responsáveis pela característica hidrofílica do tensoativo se desidratam provocando a modificação da sua afinidade pelas fases aquosa e oleosa. À medida que o sistema sofre resfriamento o tensoativo passa por um ponto de curvatura zero e promove tensão superficial mínima, o que predispõe a formação de

nanoemulsões (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SALAGER *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). O ponto de inversão no qual o tensoativo atinge a curvatura zero está diretamente relacionado ao equilíbrio da hidrofília e lipofília deste na interface.

Para que esse processo ocorra, a concentração do tensoativo deve ser superior à concentração micelar crítica (CMC) (BECHER, 1987; ZERFA, SAJJADI, BROOKS, 2001; SAJJADI, ZERFA, BROOKS, 2003; SALAGER *et al.*, 2004; XIE, BROOKS, 2004).

Pela técnica da temperatura de inversão de fases são formadas emulsões com tamanho de partícula muito pequeno e que apresentam boa estabilidade (TADROS *et al.*, 2004).

A transição espontânea da curvatura também pode ser obtida pelo método do EPI, alterando-se a fração volumétrica. Quando se deseja uma emulsão O/A, adiciona-se sucessivamente a fase aquosa na oleosa, sendo que os glóbulos de água são formados em uma fase oleosa contínua (microemulsão ou fase bicontínua A/O). Aumentando-se o volume da fração aquosa há uma inversão espontânea na curvatura do tensoativo ocorrendo a mudança da emulsão A/O para O/A (FORGIARINI *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; XIE, BROOKS, 2004, SALAGER *et al.*, 2004).

Este processo é descrito na literatura em sistemas no qual o tensoativo forma monocamadas flexíveis entre a interface água/ óleo formando uma microemulsão (fase bicontínua) ou fase cristalina no ponto da inversão (MARSZALL, 1987; FERNANDEZ *et al.*, 2004; SALAGER *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

Não apenas a tensão interfacial mínima produzida durante a inversão da curvatura do tensoativo, mas também a formação da microemulsão ou da fase cristalina anterior ao lócus da inversão é estreitamente relacionada à formação de nanoemulsões em ambos os métodos (MORALES *et al.*, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que a solubilização completa do óleo na fase bicontínua (microemulsão) ou na fase cristalina é um fator extremamente importante na formação de emulsões finamente dispersas (MORALES *et al.*, 2003).

2.7 Estabilidade

Sistemas emulsionados podem sofrer diferentes processos de instabilidade, tais como: cremeação, floculação e coalescência (SHUELLER, ROMANOWSKI, 2000).

Esses processos podem ser causados, por exemplo, pela diferença nos valores de densidade entre os líquidos dispersos, pela redução da estabilidade da interface entre outros fatores. A floculação acontece quando os glóbulos se unem e o filme interfacial é mantido, ou seja, permanecem glóbulos distintos. A coalescência acontece quando há a união dos glóbulos e a ruptura da interface, formando um glóbulo maior. É um processo irreversível e quando um número grande de glóbulos coalescem, o resultado é a separação de fases (SHUELLER, ROMANOWSKI, 2000).

Um dos maiores problemas de instabilidade relacionados às nano emulsões, entretanto, é o fenômeno “Ostwald ripening”, resultante da diferença de solubilidade entre os glóbulos, pois quanto maior a curvatura interfacial do glóbulo em dispersão, maior a área de superfície da fase dispersa e conseqüentemente maior a solubilidade do conteúdo da fase dispersa na fase dispersante. Este fator pode causar a movimentação de moléculas de óleo através de difusão passiva ou transporte assistido por micelas. Essas moléculas são transferidas dos glóbulos pequenos para os maiores, provocando alteração da granulometria da fase dispersa (SONNVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2004; CAPEK, 2004).

Deve-se observar ainda que quanto mais polidisperso o sistema, mais pronunciado será este mecanismo, pois maior será a diferença de solubilidade dos glóbulos em dispersão (CAPEK, 2004).

Um método útil para avaliar a estabilidade de uma emulsão é mensurar o tamanho dos glóbulos da fase interna da emulsão e a magnitude do potencial zeta. (MORAIS *et al.*, 2006a).

Sabe-se que o tamanho dos glóbulos dispersos de uma emulsão determina fenômenos como floculação e coalescência. Geralmente quanto menor o tamanho dos glóbulos dispersos, maior a estabilidade do sistema (JEONG, OH, KIM, 2001).

Pela análise granulométrica também é possível determinar o índice de polidispersividade da emulsão, sabendo que quanto mais polidisperso o sistema for, maior será a sua susceptibilidade ao fenômeno de Ostwald ripening (CAPEK, 2004).

Medidas do tamanho dos glóbulos após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem indicação sobre a estabilidade do sistema: quanto mais rápido os glóbulos aumentam de tamanho, menor a estabilidade do sistema (JEONG, OH, KIM, 2001; KULMYRZAEV, SCHUBERT, 2003; ROLAND *et al.*, 2003).

O potencial zeta está diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre glóbulos dispersos próximos, sendo um parâmetro que indica as propriedades da interface e da solução contínua próxima à interface (ROLAND *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2006b).

É definido como a diferença de potencial entre a superfície de íons fortemente ligados ao redor do glóbulo e uma região neutra (não-carregada) da solução e reflete a composição da interface das nano emulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial, ou a presença de moléculas com carga localizadas na interface do sistema (ROLAND *et al.*, 2003).

O método mais utilizado para mensurar o potencial zeta é através da mobilidade eletroforética de partículas dispersas em um campo elétrico carregado (LIEBERMAN, 1988; JEONG, OH, KIM, 2001; KULMYRZAEV, SCHUBERT, 2003; 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 (BENITA, LEVY, 1993; KLANG, BENITA, 1998; ROLAND *et al.*, 2003).

Alguns autores afirmam que a estabilidade de emulsões contendo tensoativos não iônicos ocorre principalmente por via estérica, porém o mecanismo eletrostático deve ser considerado (MORAIS *et al.*, 2004b).

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 sobre as condições dos glóbulos na emulsão (STACHURSKI, MICHALEK, 1996; GU, LI, 1998).

O valor do pH é um 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, uma diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres reduzem o valor de pH das formulações, sendo empregados como indicadores de estabilidade das nanoemulsões frente a diferentes condições de armazenamento. Além disso, o valor de pH final das nanoemulsões pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface (MARTINI, 2005).

A condutividade elétrica é um parâmetro indicativo de processos de instabilidade. O aumento da condutividade pode estar relacionado com a enquanto que a diminuição com a agregação (ANVISA, 2006).

2.8 Óleos essenciais

Óleos essenciais são líquidos voláteis, refringentes e com odor característico. São formados em um grande número de plantas como subproduto do metabolismo secundário, sendo que podem ser extraídos das folhas, flores, sementes, galhos, etc. O método de obtenção é a destilação por arraste de vapor d'água (MIGUEL, 1999).

Os constituintes de um óleo essencial ou óleo volátil variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis. Os compostos terpênicos constituem a maioria dos óleos essenciais. Os monoterpênicos mais comuns são: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno entre outros. Entre os sesquiterpênicos mais comuns encontram-se: farnesol, nerolidol, bisaboleno entre outros (SIMÕES *et al.*,2000).

Além dos usos mais antigos como laxante, perfume e condimentos existem diversas aplicações biológicas para esses óleos como: antimicrobiana, repelente de insetos, larvicida, antiinflamatória, analgésica, antiespasmódica, etc (DEY, HARBONE, 1997), sendo que mais recentemente as propriedades medicinais vêm sendo intensamente investigadas (ORAFIDIYA, OLADIMEJI, 2002).

2.8.1 Óleo essencial de Lavanda

O óleo essencial de Lavanda (*Lavandula officinalis*) é empregado como antimicrobiano, antiinflamatório e cicatrizante em casos de queimaduras, picadas por insetos entre outros processos inflamatórios cutâneos (BOELEN, ARQUETTE, 1995; CAVANAGH, WILKINSON, 2002).



Figura 2 - Sumidades floridas da lavanda. Reproduzido de:<<http://www.espacioblog.com>>.

Estudos fitoquímicos revelaram diferentes metabólitos secundários nas espécies da *Lavandula*, como diterpenos (POLITI *et al.*, 2002), sesquiterpenos, triterpenos, cumarinas e compostos fenólicos (GABRIELI, KOKKALOU, 2003).

O óleo essencial de lavanda pode ser extraído de diferentes espécies do gênero *Lavandula*: *Lavandula officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula latifolia*, *Lavandula stoechas* e *Lavandula intermédia* (SILVA, 1998; CAVANAGH, WILKINSON, 2002). Dependendo da espécie utilizada e das condições de cultivo o óleo essencial pode apresentar variações quanto aos constituintes (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Componentes majoritários de diversas espécies de lavanda.

Espécie	Origem	Parte da Planta	Componentes Majoritários	Referência
<i>L. dentata</i>	Algeria	Parte aérea	1,8 cineol (38,4%); Cis- Verbenol (4,3%); p-Cymen-8-ol (3,8%)	Dob t al., 2005
<i>L. stoechas</i> <i>L. ssp. stoechas</i>	Chipre	Parte aérea	Fenchona (35,8%); Cânfora (18,5%); α -Terpineol (12,9%)	Valentini <i>et al.</i> , 1993
<i>L. stoechas</i>	Grécia	Parte aérea	Fenchona (30,85%); Acetato de pinocarvil (10,2%); Cânfora (9,58%)	Kokkalou, 1988
<i>L. latifolia</i>	Espanha	Parte aérea	1,8- cineol (33,65%); Linalol (26,34%); Cânfora (5,31%)	Pascual <i>et al.</i> , 1983
<i>L. latifolia</i>	Espanha	Parte aérea	1,8- cineol (36,3%); Linalol (30,3%); Cânfora (8,0%)	Pascual <i>et al.</i> , 1989
<i>L. latifolia</i> <i>Medik</i>	Irã	flores	Linalol (31,9- 30,6%); 1,8-cineol (18,8- 20,9%); Borneol (10,1-8,9%)	Barazandeh, 2002
<i>L. angustifolia</i> <i>Mill.</i>	Lituania	Parte aérea	Acetato de linalila (26,54%); Linalol (20,98%); Acetato de lavandulila (5,49%)	Venskutonis <i>et al.</i> , 1997
<i>L. intermedia</i>	Hungria	flores	Linalol (36,0%); Acetato de linalila (19,8%); 4- terpineol (5,1%)	Oszagyán <i>et al.</i> , 1996
<i>L. pinnata</i>	Portugal	flores	β – phelladrane (31,7%); α -phelladrane (15,9%); β - cariofileno (10,5%)	Figueiredo <i>et al.</i> , 1995
<i>L. viridis</i>	Portugal	Parte aérea	1,8- cineol (21,9%); Cânfora (15,7%); - α pireno (10,3%)	Nogueira e Romano, 2002

Segundo a literatura, estão entre os constituintes presentes no óleo extraído da *Lavandula officinalis* o acetato de linalila, linalol, 1-8 cineol, 4-terpineol, ésteres butíricos e cânfora (SILVA, 1998).

Estudos demonstram que o efeito antiinflamatório está relacionado diretamente aos componentes majoritários linalol e acetato de linalina. Entretanto, este efeito é mais pronunciado quando utilizado o óleo essencial onde estão presentes todos os componentes atuando em sinergismo, do que quando utilizados os componentes majoritários isolados (BRUNETTON, 1993; SIMÕES, 1999, SOSA *et al.*, 2005).

Apesar do rendimento do processo de destilação ser baixo (0,5 a 1,0%), sendo necessários 100 a 130 Kg das sumidades floridas para extrair 1kg de óleo e por essa razão ter alto custo, o óleo essencial de lavanda é um dos mais procurados pelas indústrias relacionadas à perfumaria e cosméticos (MEUNIER, 1989; SILVA, 1998).

O primeiro relato sobre as propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes é datado de 1937, quando o químico francês Maurice René teve as mãos queimadas acidentalmente em seu laboratório colocando-as em um tanque contendo óleo essencial de lavanda, acreditando que o mesmo contivesse água. Para sua surpresa a dor foi aliviada e a queimadura cicatrizou sem infecção (SOSA *et al.*, 2005).

2.9 Óleo de maracujá

O óleo de maracujá (*Passiflora edulis seed oil*) é extraído pela prensagem a frio das sementes. Após este processo é filtrado e refinado originando um óleo amarelo pálido de odor característico (rendimento de 3%) (BERACA SABARÁ, 2006).



Figura 3 – Fruto do maracujá. Reproduzido de <[http: www.cnpmf.embrapa.br](http://www.cnpmf.embrapa.br)>.

O desenvolvimento de emulsões utilizando óleos vegetais é de grande interesse industrial, devido às atividades benéficas que a complexa composição de ácidos graxos presentes nestes óleos pode exercer na pele, além da crescente tendência de utilização de produtos vegetais pela indústria cosmética (BLOISE, 2003).

Óleos vegetais são amplamente empregados como componente básico ou composto ativo de formulações cosméticas, baseado no conceito de que apresentam baixa toxicidade e são biocompatíveis com a pele (BLOISE, 2003).

A composição de ácidos graxos no óleo de maracujá apresentou a predominância de: linoléico (68,70%), oléico (17,5%), palmítico (11,0%) e esteárico (2,80%) (PONTES, 1989).

O ácido linoléico é um ácido graxo encontrado na barreira lipídica e a sua remoção por uso de sabonetes pode causar a desidratação da pele. Acredita-se que a utilização de óleos vegetais ricos em ácido linoléico em produtos para a pele pode promover sua reposição, influenciando positivamente nas propriedades barreiras da pele, melhorando sua aparência e hidratação (GONÇALVES, 2000).

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver nanoemulsões a partir de métodos de baixa energia, contendo tensoativos não-iônicos, óleo de maracujá e óleo essencial de lavanda nas concentrações 1,0, 2,0 e 5,0% , bem como analisar a atividade antiinflamatória tópica das formulações.

3.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanoemulsões O/A contendo tensoativos não iônicos, óleo de maracujá, óleo essencial de lavanda nas concentrações de 1,0, 2,0, e 5,0% e água destilada;
- Avaliar a estabilidade física e físico-química das formulações adicionadas ou não do óleo essencial de lavanda;
- Avaliar os fatores que influenciam na formação das nanoemulsões;
- Desenvolver método de preparação a frio que possibilite a retenção do óleo essencial nas formulações;
- Avaliar a atividade antiinflamatória tópica das nanoemulsões desenvolvidas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Fase oleosa

- **Nome INCI:** *Passiflora edulis seed oil* / óleo de maracujá/ fornecedor: Beraca Sabara[®].

- **Características físico-químicas**

-coloração: amarelo pálido.

-odor característico

-densidade (g/cm³): 0,890-0,950

-índice de refração: 1,472-1,474

-índice de iodo: 115-150

-índice de saponificação: 150-210

-índice de acidez: máximo 5,0%

4.1.2 Fase aquosa

- Água destilada recém obtida.

4.1.3 Ativo

- **Nome INCI:** *lavender oil /Lavandula officinalis* / óleo essencial de lavanda/ fornecedor: Bio Essência[®].

- **Características físico-químicas:**

- coloração: líquido transparente de odor característico.

- densidade específica: 0,875 a 0,888 à 15° C.

- **Constituintes segundo informe do fornecedor:**

- Linalol 40,0%, acetato de linalina 20,0%, terpineol 5,0% ,cineol 4,0%, cânfora 3,5%, beta careofileno 2,5%, limoneno 2,0%, alfa-pineno 1,5%.

4.1.4 Tensoativos

- **Nome INCI:** PEG-30 castor oil / nome comercial: Ultroil R 300[®]/ EHL 11,7 / fornecedor: Oxiteno[®]

- **Nome INCI:** PEG-40 castor oil /nome comercial: Ultroil R 400[®]/ EHL 13,0 / fornecedor: Oxiteno[®]

- **Nome INCI:** PEG-60 castor oil / nome comercial: Emulsogen HCO 60[®]/ EHL 15,0 / fornecedor: Clariant[®]

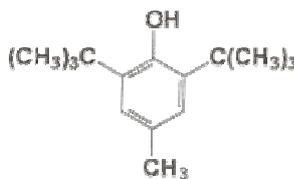
- **Nome INCI:** Monooleato de sorbitano/ nome comercial: Span 80[®] / EHL 4,3 / fornecedor: Oxiteno[®]

- **Nome INCI:** Polissorbato 80 /nome comercial: Tween 80[®] / EHL 15,0 / fornecedor: Oxiteno[®]

4.1.5 Antioxidante

- **Nome INCI:** Butil-hidróxi-tolueno (BHT)/ fornecedor: CIBA[®].

- **Estrutura química:**



- **Características físico-químicas:**

-sólido branco cristalino

-odor fraco

- ponto de fusão: 265°C

- ponto de congelamento: 68°C

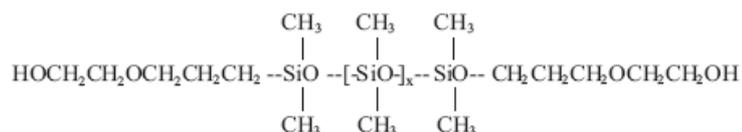
- insolúvel em água.

- **Concentração de uso:** 0,03- 0,1%.

4.1.6 Silicones

- **Nome INCI:** Bis-Hidroxietoxipropil Dimeticone/ nome comercial: Carbinol 5562/ fornecedor: Down Corning®.

- **Estrutura química:**



- **Características físico-químicas:**

-coloração: transparente e incolor

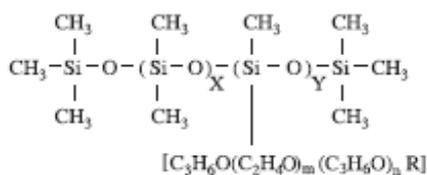
-solúvel em água

- viscosidade: 50 cSt

- **Concentração de uso:** não especificado pelo fornecedor.

- **Nome INCI:** PEG/PPG-18/18/ Dimeticone / nome comercial: 190 Fluid / fornecedor: Down Corning®

- **Estrutura química:**



- **Características físico-químicas:**

- coloração: transparente

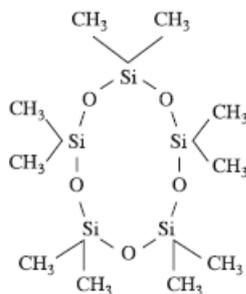
- viscosidade de 2000 mm s⁻¹ à 25°C

-densidade (25°C): 1,037

- **Concentração de uso:** 0,1-2,0%.

-**Nome INCI:** Ciclopentasiloxano / nome comercial: 245 Fluid / fornecedor: Down Corning®

- **Estrutura química:**



- **Características físico-químicas:**

- coloração: transparente

- densidade (25°C): 0,95

- ponto de ebulição a 760 mm Hg: 205°C

- ponto de congelamento: menor que -50.

- **Concentração de uso:** não especificado pelo fornecedor.

4.1.7 Tampão Mcvallaine (Na₂ HPO₄/ ácido cítrico)

Foram utilizadas 28,392g de Na₂ HPO₄ para a preparação de um litro desta solução a 0,2M e 21,008 de ácido cítrico em um litro desta solução a 0,1M. No valor de pH = 6,0 a solução tampão final foi constituída de 315,75ml da solução de Na₂ HPO₄ e 184,25ml da solução de ácido cítrico para o total de 500 ml, conforme descrito por Morita em 1988.

Os reagentes Na₂ HPO₄ e ácido cítrico foram fornecidos pela empresa Nuclear, sendo matérias primas de grau para análise (p.a.).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das emulsões

As emulsões formuladas para estudo de EHL, determinação do sistema tensoativo e obtenção das nanoemulsões foram manipuladas pelo método do EPI utilizando-se aquecimento

das fases (item 4.2.1.1). Após a escolha das formulações finais, foi utilizado o método a frio (item 4.2.1.2) para a manipulação das formulações avaliadas nos estudos subseqüentes.

4.2.1.1 Emulsificação por método do EPI utilizando aquecimento

As emulsões foram preparadas aquecendo-se as fases aquosa e oleosa separadamente à temperatura de $75\pm 5^{\circ}\text{C}$. Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa mantendo-a sob agitação (600 rpm) até que as emulsões atingissem a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2.1.2 Emulsificação a frio por método do EPI

A fase oleosa foi adicionada da mistura de tensoativos e homogeneizada por agitação manual durante 5 minutos. A fase aquosa foi lentamente adicionada e homogeneizada à fase oleosa. A homogeneização foi feita por agitação manual em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2.2 Determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá

A determinação do valor de EHL requerido pelo óleo de maracujá foi realizada a partir do valor 4,3 (valor de EHL do tensoativo lipofílico/ monooleato de sorbitano / Span 80[®]) até o valor 15,0 (valor do tensoativo hidrofílico/ polisorbato 80 / Tween 80[®]).

A porcentagem total da mistura de tensoativos foi 5,0%, sendo a de óleo de maracujá 10,0%.

Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidrofílico e lipofílico necessários para a obtenção de cada valor de EHL foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{EHL}_{\text{final}} = \frac{\text{EHL A} \times (\%) \text{ A} + \text{EHL B} \times (\%) \text{ B}}{100}$$

Legenda: **A:** tensoativo hidrofílico, **B:** tensoativo lipofílico.

A quantidade dos tensoativos hidrofílico e lipofílico para cada valor de EHL estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Concentração de tensoativos lipofílico e hidrofílico utilizados na determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá.

Valor de EHL	Tensoativo Lipofílico- Monooleato de sorbitano % (p/p)	Tensoativo hidrofílico – Polissorbato 80 % (p/p)
4,3	5,00	-
5,0	4,67	0,33
6,0	4,21	0,79
7,0	3,74	1,26
8,0	3,27	1,73
9,0	2,80	2,20
10,0	2,34	2,66
11,0	1,87	3,13
12,0	1,40	3,60
13,0	0,93	4,07
14,0	0,47	4,53
15,0	-	5,00

Legenda: EHL: Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo; p/p: peso em peso.

4.2.3 Determinação do sistema tensoativo

Com o intuito de escolher o sistema tensoativo que melhor estabilizasse a dispersão constituída de óleo de maracujá, óleo essencial de lavanda e água, foram testados diversos pares de tensoativos contendo tensoativo hidrofílico com diferentes graus de etoxilação e o tensoativo lipofílico monooleato de sorbitano. A quantidade de cada um foi calculada para que atingissem o valor de EHL do óleo de maracujá previamente determinado através do método descrito em 4.2.2. A composição das formulações está descrita na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Denominação e composição (p/p) das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.

Formulação	% Composição (p/p)							
	Óleo de Lavanda	Óleo de maracujá	Polisorbato 80	PEG- 30 castor oil	PEG-40 castor oil	PEG-60 castor oil	Monooleato de Sorbitano	Água destilada
2 A	2,0	5,0	2,66	-	-	-	2,34	88,0
5 A	5,0	5,0	2,66	-	-	-	2,4	85,0
2 B	2,0	5,0	-	3,85	-	-	1,15	88,0
5B	5,0	5,0	-	3,85	-	-	1,15	85,0
2C	2,0	5,0	-	-	3,78	-	1,72	88,0
5 C	5,0	5,0	-	-	3,78	-	1,72	85,0
2 D	2,0	5,0	-	-	-	2,66	2,34	88,0
5 D	5,0	5,0	-	-	-	2,66	2,34	85,0

Legenda: A: PEG-30 castor oil e Monooleato de sorbitano, B: PEG-40 castor oil e Monooleato de sorbitano, C: PEG-60 castor oil e Monooleato de sorbitano, D: Polissorbato 80 e Monooleato de sorbitano, p/p: peso em peso.

4.2.4 Influência da adição do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido pelo sistema

A influência da adição do óleo de lavanda no valor de EHL do sistema foi avaliada utilizando dois pares de tensoativos: *PEG-30 castor oil* e *PEG-40 castor oil* em associação ao monooleato de sorbitano. A composição das formulações está descrita na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Composição das formulações para a avaliação da influência do óleo essencial no EHL do sistema.

Formulação	% Fase oleosa (p/p)		% Fase Tensoativa (p/p)			% Água Destilada (p/p)	EHL
	Óleo de Lavanda	Óleo de Maracujá	<i>PEG-30 castor oil</i>	<i>PEG-40 castor oil</i>	Monooleato de Sorbitano		
8-A	5,0	5,0	2,50	-	2,50	85,0	8,0
9-A	5,0	5,0	3,8	-	1,82	85,0	9,0
10-A	5,0	5,0	3,85	-	1,15	85,0	10,0
11-A	5,0	5,0	4,53	-	0,47	85,0	11,0
11,7-A	5,0	5,0	5,00	-	-	85,0	11,0
8-B	5,0	5,0	-	2,13	2,87	85,0	8,0
9-B	5,0	5,0	-	2,70	2,30	85,0	9,0
10-B	5,0	5,0	-	3,28	1,72	85,0	10,0
11-B	5,0	5,0	-	3,85	1,15	85,0	11,0
12-B	5,0	5,0	-	4,43	0,57	85,0	12,0
13-B	5,0	5,0	-	5,00	-	85,0	13,0

Legenda: **A:** *PEG-30 castor oil* e Monooleato de sorbitano, **B:** *PEG-40 castor oil* e Monooleato de sorbitano, **EHL:** Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo; **p/p:** peso em peso.

4.2.5 Obtenção das nanoemulsões

Para a obtenção de nanoemulsões contendo 1, 0, 2,0 e 5,0% do óleo essencial de lavanda, foram preparadas emulsões na qual a fração da fase oleosa fosse alterada e a da fase emulgente mantida fixa em 5,0%.

As formulações foram preparadas utilizando o óleo de maracujá como único constituinte da fase oleosa (**Tabela 5**) e com a associação dos óleos de maracujá e lavanda (**Tabela 6**). As emulsões obtidas foram caracterizadas segundo item 4.2.7 e submetidas aos testes de estabilidade preliminar.

Tabela 5 – Composição das formulações contendo óleo de maracujá como fase oleosa.

Formulação	%Composição (p/p)			
	Óleo de maracujá	PEG-30 castor oil	Monooleato de sorbitano	Água destilada
M6	6,0	3,85	1,15	89,0
M7	7,0	3,85	1,15	88,0
M8	8,0	3,85	1,15	87,0
M9	9,0	3,85	1,15	86,0
M10	10,0	3,85	1,15	85,0
M12	12,0	3,85	1,15	83,0
M15	15,0	3,85	1,15	80,0

Legenda: **M**: óleo de maracujá, **p/p**: peso em peso.

Tabela 6 - Composição das formulações contendo óleos de maracujá e lavanda como fase oleosa.

Formulação	% Composição (p/p)					
	Óleo de Lavanda	Óleo de Maracujá	Total da fase oleosa	PEG- 30 castor oil	Monooleato de Sorbitano	Água destilada
L1-M5	1,0	5,0	6,0	3,85	1,15	89,0
L1-M7	1,0	7,0	8,0	3,85	1,15	87,0
L1-M8	1,0	8,0	9,0	3,85	1,15	86,0
L1-M9	1,0	9,0	10,0	3,85	1,15	85,0
L1-M11	1,0	11,0	12,0	3,85	1,15	83,0
L1-M14	1,0	14,0	15,0	3,85	1,15	80,0
L2-M5	2,0	5,0	7,0	3,85	1,15	90,0
L2-M8	2,0	8,0	10,0	3,85	1,15	85,0
L2-M10	2,0	10,0	12,0	3,85	1,15	83,0
L2-M13	2,0	13,0	15,0	3,85	1,15	80,0
L5-M5	5,0	5,0	10,0	3,85	1,15	85,0
L5-M7	5,0	7,0	12,0	3,85	1,15	83,0
L5-M10	5,0	10,0	15,0	3,85	1,15	80,0

Legenda: **L**: óleo de lavanda, **M**: óleo de maracujá, **p/p**: peso em peso.

Foram escolhidas as formulações contendo 1,0, 2,0 e 5,0% do óleo de lavanda que apresentaram maior estabilidade e menor tamanho de glóbulo para os estudos posteriores e nomeadas respectivamente de F1, F2 e F5 em referência ao conteúdo de óleo essencial contido na formulação.

4.2.6 Influência das variáveis do processo de obtenção das nanoemulsões

4.2.6.1 Influência da quantidade de tensoativo

Foram preparadas formulações pelo método de emulsificação a frio, descrito no item 4.2.1.2, contendo 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0% (p/p) da mistura de tensoativos (**Tabela 7**). As

amostras foram analisadas macroscopicamente e quanto à distribuição granulométrica em 24 horas e 30 dias após o preparo.

Tabela 7 – Composição das formulações manipuladas para análise da influência da quantidade de tensoativo.

Formulação	% Composição (p/p)					Água destilada
	Óleo de Lavanda	Óleo de Maracujá	PEG- 30 castor oil	Monooleato de Sorbitano	Total de Tensoativo	
F1-3	1,0	5,0	2,32	0,68	3,0	91,0
F1-4	1,0	5,0	3,08	0,92	4,0	90,0
F1-5	1,0	5,0	3,85	1,15	5,0	89,0
F1-6	1,0	5,0	4,62	1,38	6,0	88,0
F1-7	1,0	5,0	5,40	1,60	7,0	87,0
F2-3	2,0	5,0	2,32	0,68	3,0	90,0
F2-4	2,0	5,0	3,08	0,92	4,0	89,0
F2-5	2,0	5,0	3,85	1,15	5,0	88,0
F2-6	2,0	5,0	4,62	1,38	6,0	87,0
F2-7	2,0	5,0	5,40	1,60	7,0	86,0
F5-3	5,0	5,0	2,32	0,68	3,0	87,0
F5-4	5,0	5,0	3,08	0,92	4,0	86,0
F5-5	5,0	5,0	3,85	1,15	5,0	85,0
F5-6	5,0	5,0	4,62	1,38	6,0	84,0
F5-7	5,0	5,0	5,40	1,60	7,0	83,0

4.2.6.2 Influência da velocidade de agitação

As emulsões foram manipuladas pelo método de emulsificação a frio descrito no item 4.2.1.2 e posteriormente submetidas às velocidades de agitação descritas pelos métodos:

-Método A: submetidas à agitação a 600 rpm (agitador Fisatom) por 5 minutos.

-Método B: submetidas à agitação a 8000 rpm (Ultra Turrax) por 5 minutos.

-Método C: submetidas à agitação a 9000 rpm (Ultra Turrax) por 5 minutos.

As emulsões obtidas nos diferentes métodos foram submetidas à análise macroscópica, centrifugação e determinação da distribuição granulométrica.

4.2.6.3 Influência da adição de eletrólitos

A fase aquosa das emulsões foi substituída por solução tampão Mcvallaine (Na₂HPO₄ / ácido cítrico) no valor de pH = 6,0 sendo as emulsões preparadas nas condições

estabelecidas no item 4.2.1.2. Foram acompanhados os valores de pH em 24h, 7 e 30 dias após o preparo, bem como o valor de potencial zeta após 24 horas da manipulação.

4.2.6.4 Influência da adição de silicones

As formulações foram adicionadas dos silicones, carbinol, 245 Fluid e 190 Fluid na concentração de 0,5% (p/p) (**Tabela 8**), sendo preparadas nas condições estabelecidas no item 4.2.1.2 e submetidas aos testes de estabilidade e à determinação da distribuição granulométrica.

Tabela 8 - Composição das formulações adicionadas de silicones.

Formulação	Óleo de Lavanda	Óleo de Maracujá	% Composição (p/p)		Carbinol 5562 [®]	245 Fluid [®]	190 Fluid [®]	Água destilada
			Total de Tensoativo					
			PEG-30 castor oil	Monooleato de sorbitano				
F1-carb	1,0	5,0	3,85	1,15	0,5	-	-	88,5
F1-245	1,0	5,0	3,85	1,15	-	0,5	-	88,5
F1-190	1,0	5,0	3,85	1,15	-	-	0,5	88,5
F2-carb	2,0	5,0	3,85	1,15	0,5	-	-	87,5
F2-245	2,0	5,0	3,85	1,15	-	0,5	-	87,5
F2-190	2,0	5,0	3,85	1,15	-	-	0,5	87,5
F5-carb	5,0	5,0	3,85	1,15	0,5	-	-	84,5
F5-245	5,0	5,0	3,85	1,15	-	0,5	-	84,5
F5-190	5,0	5,0	3,85	1,15	-	-	0,5	84,5

Legenda: carb: carbinol 5562[®], 245: 245 Fluid[®], 190: 190 Fluid[®].

4.2.6.5 Determinação do Ponto de Turvação (Cloud Point) do tensoativo hidrofílico

A determinação da temperatura de turvação foi realizada aquecendo-se em chapa metálica, a solução a 1,0% do tensoativo hidrofílico em água mili-Q.

A temperatura foi monitorada com auxílio de um termômetro. A turbidez da solução foi avaliada macroscopicamente (MARSZALL, 1987), sendo considerada turva quando não foi possível a visualização de um objeto situado a 5 cm do béquer contendo a solução.

4.2.6.6 Determinação da temperatura de inversão de fases

A temperatura de inversão de fases foi determinada com auxílio de um condutivímetro (DIGIMED[®] Modelo CD- 20) com aquecimento da amostra em chapa metálica sob

temperatura controlada com auxílio de um termômetro. As leituras foram feitas a partir da temperatura ambiente 25 ± 2 °C e a cada incremento de 5 graus, até 90 graus.

A fase aquosa da formulação foi substituída por solução de NaCl 10^{-2} M para facilitar a observação da inversão de fases, sendo que nesta concentração os eletrólitos não causam interferência no método (TADROS et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2005).

A inversão da emulsão de O/A para A/O é determinada quando ocorreu diminuição brusca no valor de condutividade elétrica (FERNANDEZ et al., 2004).

4.2.7 Caracterização físico-química das formulações

A caracterização das emulsões foi realizada pelos parâmetros: distribuição granulométrica, potencial zeta, valor de pH e condutividade elétrica. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.7.1 Determinação da distribuição granulométrica e do potencial zeta

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada através do equipamento DELSA 440 SX (Coulter Electronics, MA, USA). Este sistema analisa partículas e colóides de 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; 17,6; 26,3 e 35,2°). A distribuição de tamanho das partículas é baseada em análise espectroscópica fóton-correlacionada que caracteriza, com a iluminação de um laser, o tamanho das partículas em um meio fluido (SANTOS, 2006). Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da derivação da mobilidade eletroforética dada por este aparelho.

As amostras foram diluídas em água destilada recém obtida na concentração adequada para a realização da análise no equipamento, sendo que o tamanho de partícula de nanoemulsões não é alterado pela diluição em água destilada (FERNANDEZ et al., 2004).

4.2.7.2 Determinação do valor de pH

O peagômetro (modelo PM 608- Analion) foi calibrado com as soluções tampão padrões e o valor do pH foi medido inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (ANVISA, 2006).

4.2.7.3 Determinação da condutividade elétrica

O condutivímetro (DIGIMED® Modelo CD- 20) foi calibrado com solução padrão de KCl 0,1 N . A medida da condutividade elétrica das emulsões foi realizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, adicionando o eletrodo diretamente na amostra (GRIFFIN, 1967; DAVIS, 1997; PRISTA, 1981; COMELLES, 1989; MARTIN, 1990; FERRARI, 1998).

4.2.8 Avaliação da estabilidade preliminar

4.2.8.1 Avaliação macroscópica

Esta avaliação foi realizada após vinte e quatro horas (estabilidade intrínseca) da manipulação da emulsão sendo que foram analisados tanto os sinais de instabilidade macroscópica como cremeação ou separação de fases (Roland et al., 2003) quanto os aspectos físicos de nanoemulsões como translucência, fluidez e reflexo azulado. As emulsões que não apresentaram separação de fases foram submetidas aos testes de estabilidade, nos quais utilizou-se a nomenclatura abaixo:

N = normal, sem alteração; *CL* = cremeação leve; *CI* = cremeação intensa;
SF = separação de fases.

4.2.8.2 Avaliação microscópica:

Uma pequena quantidade de cada formulação foi colocada sobre lâmina de vidro e coberta com lamínula sob ligeira pressão. A lâmina foi submetida a análise microscópica (Microscópio Olympus BX-50), na qual foi avaliada a homogeneidade e morfologia da dispersão (SANTOS, 2006).

4.2.8.3 Centrifugação

A quantidade de 5g de cada amostra foi acondicionada em tubo de vidro graduado e 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, 2006). Foram observadas macroscopicamente quanto à cremeação ou separação de fases e classificadas conforme descrito no item 4.2.8.1.

4.2.8.4 Estresse Térmico

As emulsões foram submetidas a aquecimento em banho ultratermostático (Nova Técnica Ltda-Mod. 281 NT) na faixa de temperatura de 50 à 80°C, sendo o aumento da temperatura realizado de 5 em 5°C, mantendo-se cada temperatura por 30 minutos (BRACONI et al., 1995). Foram macroscopicamente analisadas quanto à ocorrência de cremeação ou separação de fases a cada mudança de temperatura.

4.2.9 Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

As amostras foram submetidas a condições variáveis de tempo e temperatura (4 ± 2 , 25 ± 2 e $45 \pm 2^\circ\text{C}$) (WITTERN et al., 1985; IDSON, 1988; IDSON, 1993a, RIBEIRO, KHURY, GOTTARDI, 1996; RIEGER, 1996; FERRARI, 1998) pelo período de 60 dias e avaliadas

quanto às características macroscópicas de instabilidade, bem como determinada sua granulometria, potencial zeta, valores de pH e condutividade elétrica.

4.2.10 Extração do óleo essencial de lavanda em nanoemulsões após o TEA e avaliação dos seus constituintes por CG/MS

O experimento consistiu na extração do óleo de lavanda das nanoemulsões após o serem submetidas ao TEA durante 60 dias e posterior análise dos seus constituintes por CG/MS.

A extração consistiu em acondicionar a emulsão em análise e 400g de água destilada em balão volumétrico de 1l. Este foi colocado em manta aquecedora e conectado ao Clevenger, como demonstra a **Figura 4**.

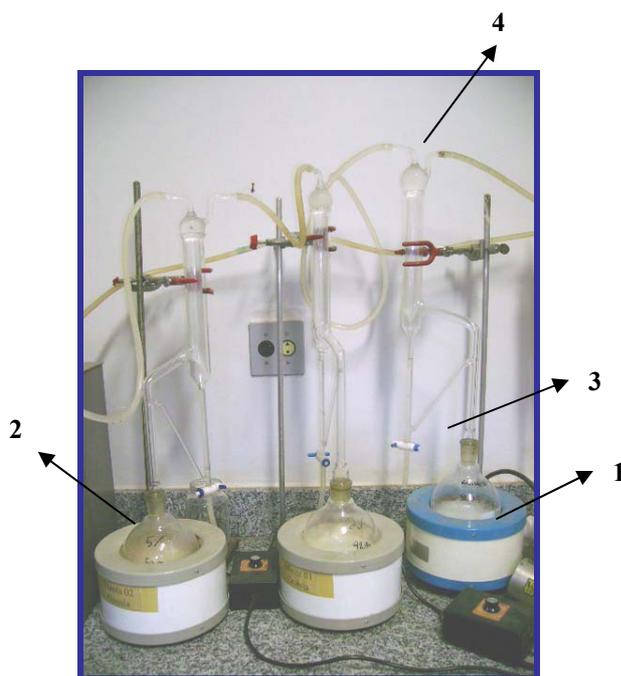


Figura 4 - Clevenger: 1: manta aquecedora, 2: balão volumétrico, 3: coletor, 4: sistema de resfriamento.

Neste método, os compostos voláteis presentes na solução/dispersão sofrem ebulição e são arrastados pelo vapor de água. Os vapores sofrem condensação ao passar por uma

serpentina resfriada, sendo que as gotículas do condensado escoam pelo compartimento do aparelho. Após o término do experimento, é possível a separação do óleo pela diferença de densidade entre este e a água.

O tempo de experimento foi padronizado em 1, 2 ou 3h a fim de avaliar o tempo necessário para que houvesse a maior recuperação do óleo essencial.

A determinação dos constituintes do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS) modelo QP2010- Shimadzu. A coluna utilizada foi a DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). Foi utilizado o método preconizado por Robert Adams em 1995.

As condições analíticas foram: gás de arraste: hélio, volume injetado: 1ml, fator de diluição: 1, temperatura da coluna: 60°C, temperatura de injeção: 250°C, controle de fluxo: velocidade linear (48,1cm/s), fluxo total: 57,6 ml/min, fluxo na coluna: 1,33ml/min, fluxo de injeção: 3ml/min e pressão: 81,9 Pka, taxa de injeção: 40,0.

Os resultados foram analisados pela base de dados Wiley 7® e pelo cálculo do índice de Kovat's, através da fórmula:

$$IK = 100 \cdot n + 100 \left(\frac{tri - trn}{trm - trn} \right)$$

IK: Índice de Kovats;

n: número de carbonos do alcano que elui anteriormente à amostra;

tri: tempo de retenção do composto em análise;

trn: tempo de retenção do alcano que elui anteriormente à amostra;

trm: tempo de retenção do alcano que elui posteriormente à amostra.

O índice de Kovats é um dos métodos mais confiáveis para identificar os componentes de um óleo essencial. Este índice é determinado através da injeção de uma mistura de n-

alcanos com tempo de retenção e ordem de ebulição conhecidos, juntamente com o óleo que terá seu índice calculado (MIGUEL, 1999).

Neste trabalho a composição química do óleo essencial da *Lavandula officinalis* foi determinada pelo cálculo do índice de Kovats de cada componente e a comparação com os espectros de massa destes com os padrões de igual índice de retenção encontrados na literatura (ADAMS, 1995).

4.2.11 Avaliação da atividade antiinflamatória tópica das nanoemulsões

4.2.11.1 Animais experimentais:

A avaliação da atividade antiinflamatória das emulsões foi realizada pelo método de indução do eritema, utilizando camundongos sem pelo (n= 3-5), linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos (peso médio de 30g) após a aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo (protocolo nº 07.1.994.53.5) (Anexo 1). Os animais foram criados no biotério da FCFRP-USP com suprimento de água e ração à vontade. O experimento foi conduzido no biotério da FCFRP-USP mantendo-se as mesmas condições de ciclo de luz/ umidade/ temperatura e mesma dieta alimentar.

4.2.11.2 Sistema e fonte de irradiação UV

A fonte de luz a utilizada para indução do eritema foi uma lâmpada ultravioleta fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical Holand) a qual emite radiação na faixa de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm (<http://www.philips/light.com>). A fonte de luz foi instalada em um compartimento de madeira, e os animais foram colocados em caixas plásticas a uma distância de 20 cm abaixo da lâmpada (DE ROSA, 2002; CASAGRANDE, 2005; MARQUELE-OLIVEIRA, 2007). A parte

superior das caixas foi coberta com uma tela plástica para manter os animais dentro das caixas com as regiões dorsais diretamente expostas à radiação UV.

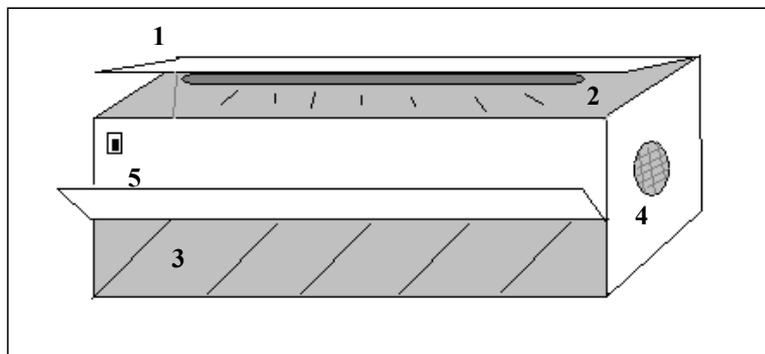


Figura 5 – Compartimento de madeira contendo fonte de luz UVB utilizado nos experimentos de indução da inflamação cutânea em camundongos sem pêlo. 1: tampa superior; 2: lâmpada UVB; 3: tampa frontal; 4: local para ventilação; 5: acionamento da lâmpada UVB. Reproduzido de MARQUELE-OLIVEIRA, 2007.

4.2.11.3 Medida da irradiância da lâmpada UV e cálculo do tempo de exposição

A medida da irradiância, taxa de fluxo de energia em Watts /cm² foi realizada utilizando radiômetro modelo IL 1700 com detector para radiação UV (SED 005) e UVB (SED 240). A irradiância foi medida na presença da tela plástica, na mesma altura que os animais permaneceram nas caixas.

A dose de irradiação necessária para indução eritemática para o sistema proposto já havia sido previamente determinada por Marquele-Oliveira (2007), correspondendo à 188mJ/cm². Neste experimento foi utilizada a dose correspondente a duas vezes a dose eritemática mínima (DEM) (MARQUELE-OLIVEIRA, 2007). A dose de exposição foi calculada multiplicando a irradiância pelo tempo de exposição em segundos.

4.2.11.4 Tratamento dos animais

O protocolo experimental utilizou quatro grupos (n=3): **grupo 1:** controle, não tratado, **grupo 2:** tratado com emulsão base (sem a adição do óleo de lavanda), **grupo 3:** tratado com

emulsão contendo 5,0% do óleo de lavanda, **grupo 4:** tratado com óleo de lavanda. A quantidade aplicada foi de 500 mg para os grupos tratados.

A coloração da pele da região dorsal dos animais foi medida em triplicata antes do experimento, logo após a irradiação, e após 2, 5, 10, 24, 48 e 72 horas, através do aparelho Chroma Meter Minolta®. A diferença do valor de (a), Δa , foi calculado utilizando o maior valor de (a) obtido menos o valor obtido antes da irradiação sendo que as médias obtidas foram analisadas pelo test-t ($p < 0,05$).

4.2.11.5 Sistema Chroma Meter Minolta

O Chroma Meter é um sistema de avaliação de cores, que atribui valores equivalentes à: luminosidade (L), proximidade do vermelho ou do verde (a), proximidade do amarelo ou do azul (b) e situam as cores nessas três coordenadas. Esse sistema transforma valores subjetivos em dados numéricos facilitando a identificação e variação da cor e proporcionando resultados confiáveis (CHARDON, CRETOIS, HOURSEAU, 1991).

A vermelhidão cutânea (eritema) foi avaliada como parâmetro inflamatório de acordo com metodologia proposta por Proksch e colaboradores (2005) sendo ação inflamatória mensurada pelo aumento do valor de (a) e antiinflamatória pela diminuição do valor de (a).

4.2.12 Análise Estatística:

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa GraphPadPrism® utilizando a análise de variância ANOVA ou teste-t. O teste Tukey foi utilizado como análise complementar para comparação de diferentes grupos. Foi utilizado o intervalo de confiança de 95% , sendo consideradas diferenças significativas àquelas que apresentaram valores de $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do EHL requerido para o óleo de maracujá

Para a preparação de emulsão estável deve-se considerar o EHL e a solubilidade da cadeia lipídica do tensoativo na fase oleosa (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). O valor de EHL necessário para emulsificar um óleo pode ser determinado empiricamente, isto é, pela preparação de emulsões com tensoativos de vários valores de EHL, e assim determinar qual valor de EHL produz a emulsão mais estável (BECHER, 2001; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG 2001).

Entre as emulsões obtidas com o par de tensoativos polisorbato 80 e monooleato de sorbitano nos valores de EHL entre 4,3 e 15,0, a emulsão no valor de EHL 10,0 foi a única que se manteve inalterada após 24 horas da manipulação, sendo que as demais apresentaram cremeação após este período.

5.2 Determinação do sistema tensoativo

Segundo a literatura, emulsões O/A mais estáveis são formadas com uma combinação de tensoativos lipofílico (baixo valor de EHL) e hidrofílico (alto valor de EHL), visto que cada tipo de emulsificante se adsorverá fortemente à fase correspondente promovendo a formação de um filme interfacial coeso, ainda que seja possível obter formulações estáveis utilizando um único tensoativo (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001; PINHO, STORPIRTIS, 1998; PRISTA, 1992).

Baseado nestes conceitos, optou-se pela utilização de pares de tensoativos, contendo tensoativo hidrofílico não-iônico com diferentes graus de etoxilação ou polisorbato 80 (alto valor de EHL) associados ao tensoativo lipofílico (baixo valor de EHL), monooleato de sorbitano. Os parâmetros observados na análise macroscópica foram a estabilidade física do

sistema, bem como a presença de características relacionadas à nanoemulsões, como translucência e reflexo azulado (MORALES et al., 2003; TADROS et al., 2004) Na análise microscópica observou-se a morfologia e homogeneidade da amostra, bem como a presença de movimento Browniano como descrito nas **Tabelas 9 e 10**.

Tabela 9 - Análise macroscópica e microscópica das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.

Formulação	Análise Macroscópica			Análise Microscópica	
	Reflexo azulado	Cremação	Translucente/Leitosa	Homogeneidade	Movimento Browniano
2A	-	-	Lt	+	-
5A	-	-	Lt	+++	-
2B	+	-	Lt	+++	+
5B	+	-	Lt	++	+
2C	-	-	Lt	+++	-
5C	+	-	Lt	+++	+
2D	-	-	Lt	+++	-
5D	-	-	Lt	+++	-

Legenda: **A:** PEG-30 castor oil e Monooleato de sorbitano, **B:** PEG-40 castor oil e Monooleato de sorbitano, **C:** PEG-60 castor oil e Monooleato de sorbitano, **D:** Polissorbato 80 e Monooleato de sorbitano, **Lt:** leitosa; **T:** translucente; + : intensidade baixa; ++ : intensidade média; +++ : intensidade alta; - : ausência da característica.

Tabela 10 - Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.

Formulação	Centrifugação	Estresse térmico (°C)									
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	
2A	SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5A	SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2C	N	N	N	N	N	N	CL	CL	CL	CL	
5C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
2D	SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5D	SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: **A:** PEG-30 castor oil e Monooleato de sorbitano, **B:** PEG-40 castor oil e Monooleato de sorbitano, **C:** PEG-60 castor oil e Monooleato de sorbitano, **D:** Polissorbato 80 e Monooleato de sorbitano, **N:** normal ; **CL:** cremação leve; **CI:** cremação intensa; **SF:** separação de fases.

Os pares de tensoativos constituídos por PEG-30 e PEG-40 castor oil associados ao monooleato de sorbitano foram os que apresentaram maior estabilidade frente aos testes

preliminares, o que sugere que a mistura de tensoativos no valor de EHL requerido pelo óleo, favorece, mas não garante de forma inequívoca a formação de emulsões estáveis.

Segundo Gullapali e Sheth (1999), a similaridade estrutural entre a mistura de tensoativos e a fase dispersa é um fator mais relevante que o valor de EHL para a obtenção de emulsões estáveis.

Os pares de tensoativos compostos por *PEG-30 castor oil* e *PEG-40 castor oil* associados ao monooleato de sorbitano foram escolhidos para os estudos subseqüentes devido a maior estabilidade física e à presença de características relacionadas a emulsões com distribuição granulométrica nanométrica.

5.3 Influência da adição do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido para o sistema

Segundo a literatura, a combinação de tensoativos com valor final de EHL próximo ao requerido pela fase oleosa favorece a obtenção de emulsões estáveis (AUNTON, 1995; GONÇALVES, 2000; MORAIS *et al.*, 2006 a.).

O EHL requerido para o óleo de maracujá foi determinado anteriormente com o par de tensoativos composto de polisorbato 80 e monooleato de sorbitano, porém o EHL deve ser determinado para cada sistema tensoativo em questão. Além disso, a solubilidade do tensoativo entre as fases pode sofrer influência da presença de outros compostos oleosos presentes na formulação, bem como do valor de pH, presença de íons, razão entre as fases aquosa e oleosa e presença de solventes orgânicos na fase aquosa (SALAGER *et al.*, 2003).

Para avaliar a influência do óleo essencial de lavanda no valor de EHL do sistema, foram manipuladas emulsões variando-se o EHL entre 8,0 e 11,7 para o sistema composto de *PEG-30 castor oil* e monooleato de sorbitano e de 8,0 a 13,0 para o sistema composto de *PEG-40 castor oil* e monooleato de sorbitano. Esta faixa de EHL foi escolhida a partir do

valor 8,0 até o valor de EHL do tensoativo hidrofílico utilizado. A **Tabela 11** descreve os resultados obtidos na análise macroscópica.

Tabela 11 - Análise macroscópica das formulações manipuladas para a avaliação da influência do óleo essencial de lavanda no valor de EHL requerido para o sistema.

Formulação	Valor de EHL	Análise Macroscópica		
		Reflexo azulado	Cremação	Translucente/Leitosa
8-A	8,0	+	+	Lt
9-A	9,0	++	-	Lt
10-A	10,0	+++	-	T
11-A	11,0	++	+	T
11,7-A	11,7	-	+	Lt
8-B	8,0	+	+	Lt
9-B	9,0	++	-	Lt
10-B	10,0	++	-	Lt
11-B	11,0	+	-	Lt
12-B	12,0	-	+	Lt
13-B	13,0	-	+	Lt

Legenda: **A:** PEG-30 castor oil e Monooleato de sorbitano , **B:** PEG-40 castor oil e Monooleato de sorbitano , **Lt:** leitosa; **T:** translúcente; **+** : intensidade baixa; **++** : intensidade média; **+++** :intensidade alta; **-** : ausência da característica.

As emulsões com valores de EHL 9,0 e 10,0 apresentaram maior estabilidade física e presença de reflexo azulado. Este resultado sugere que a adição do óleo essencial de lavanda não provocou mudança no valor de EHL requerido pelo sistema em análise.

O par de tensoativos constituído por PEG-30 castor oil e monooleato de sorbitano foi mais favorável à obtenção do sistema desejado e por isso foi escolhido para o desenvolvimento das nanoemulsões.

5.4 Obtenção das nanoemulsões

Segundo Fernandez e colaboradores (2004) o método de inversão de fases pela mudança da fração volumétrica é um método eficiente na produção de nanoemulsões e depende mais da razão entre as fases oleosa e emulsificante do que da fase aquosa. Baseado neste conceito foram preparadas emulsões variando-se a concentração da fase oleosa e mantendo a concentração da mistura de tensoativos em 5,0%. Para a análise da influência do óleo de

lavanda na distribuição granulométrica e estabilidade do sistema, foram manipuladas emulsões contendo o óleo de maracujá adicionado ou não do óleo essencial de lavanda como constituintes da fase oleosa.

As **Tabelas 12 e 13** apresentam os resultados da análise macroscópica e microscópica e a **Figura 6** as fotomicrografias das formulações obtidas

Tabela 12 - Análise macro e microscópica das formulações contendo óleo de maracujá.

Formulação	Análise Macroscópica			Análise Microscópica	
	Reflexo azulado	Cremeação/ Separação de fases	Translucente/ Leitosa	Homogeneidade	Movimento Browniano
M6	+	-	Lt	+++	-
M7	-	-	Lt	+++	-
M8	-	-	Lt	++	-
M9	-	-	Lt	++	-
M10	-	CI	Lt	+	-
M12	-	CI	Lt	+	-
M15	-	CI	Lt	+	-

Legenda: M: óleo de maracujá, CL: cremeação leve; CI: cremeação intensa; SF: separação de fases, Lt: leitosa; T: translúcente; + : intensidade baixa; ++ : intensidade média; +++: intensidade alta; -: ausência da característica.

Tabela 13 - Análise macro e microscópica das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda.

Formulação	Análise Macroscópica			Análise Microscópica	
	Reflexo azulado	Cremeação/ Separação de fases	Translucente/ Leitosa	Homogeneidade	Movimento Browniano
L1-M5	+	-	T	+++	-
L1-M6	+	-	Lt	+++	-
L1-M7	+	-	Lt	++	-
L1-M8	-	-	Lt	++	-
L1-M9	-	-	Lt	++	-
L1-M11	-	CL	Lt	+	-
L1-M14	-	CL	Lt	+	-
L2-M5	+	-	T	+++	-
L2-M8	+	-	Lt	+++	-
L2-M10	-	-	Lt	+++	-
L2-M13	-	-	Lt	+	-
L5-M5	+	-	T	+++	-
L5-M7	+	-	Lt	+++	-
L5-M10	+	-	Lt	++	-

Legenda: L: óleo de lavanda, M: óleo de maracujá, CL: cremeação leve; CI: cremeação intensa; SF: separação de fases, Lt: leitosa; T: translúcente; + : intensidade baixa; ++ : intensidade média; +++ : intensidade alta; -: ausência da característica.

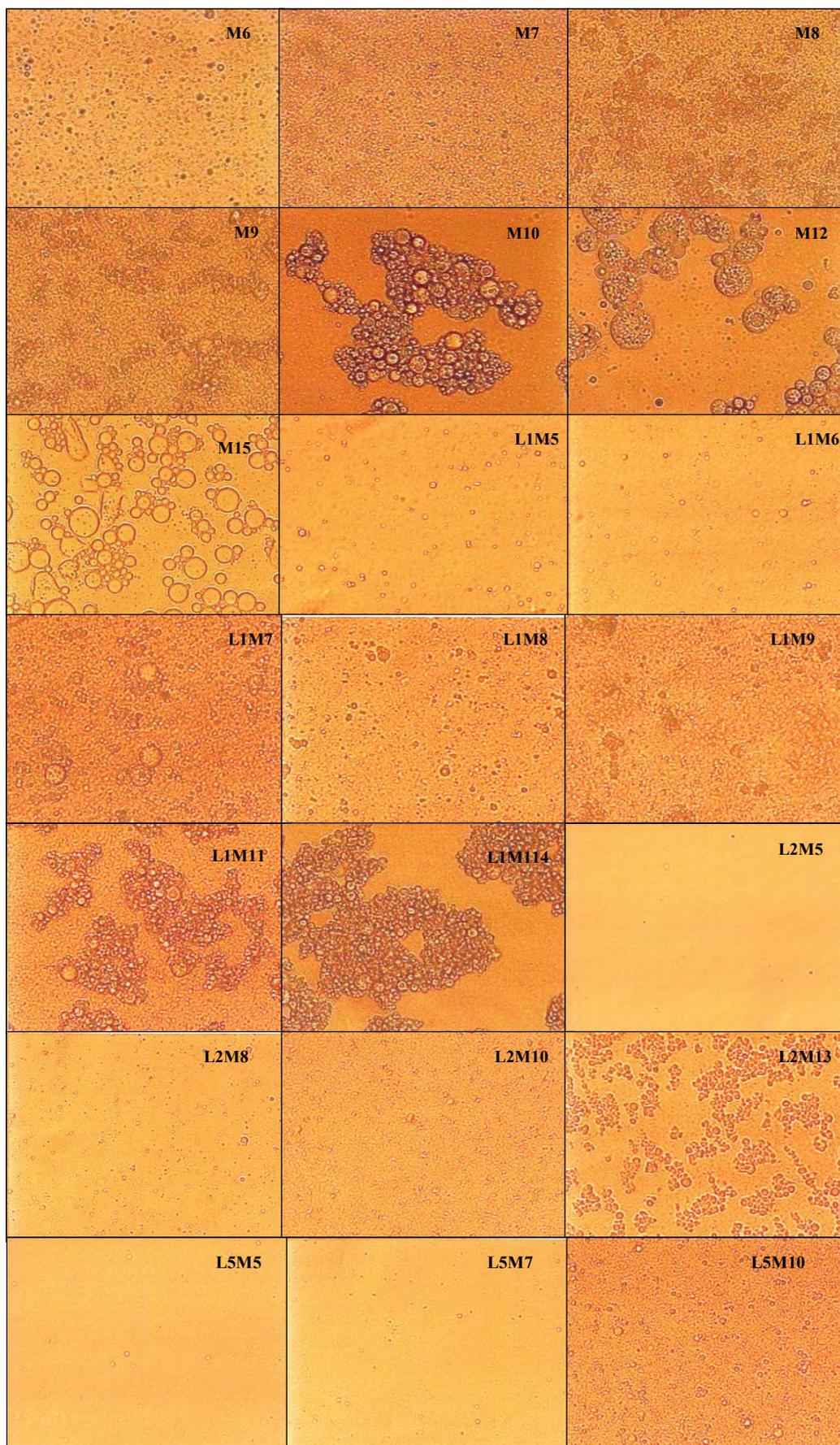


Figura 6 - Fotomicrografias das emulsões obtidas com óleo de maracujá ou com a associação dos óleos de maracujá e de lavanda após 24h do preparo (aumento de 400x).

Na análise macroscópica as formulações contendo óleo de lavanda apresentaram características apresentadas em emulsões com tamanho de glóbulos diminutos, tais como: reflexo azulado, translucência, maior estabilidade intrínseca (MORALES *et al.*, 2003; TADROS *et al.*, 2004) Na caracterização microscópica apresentaram glóbulos menores e maior homogeneidade do que aquelas formuladas com óleo de maracujá na mesma razão óleo/ tensoativo. Foi notável que quanto maior o conteúdo de óleo de lavanda em relação à porcentagem total da fase oleosa, mais acentuada foi a presença dessas características.

As emulsões que apresentaram mais intensidade nas características desejadas tinham não apenas o óleo essencial de lavanda, como também menor conteúdo de fase oleosa (maior proporção de tensoativo) sugerindo que esses fatores foram relevantes para a obtenção de emulsões com tamanho de glóbulos diminutos. Morales e colaboradores (2003) relataram resultados semelhantes, ou seja, observaram o aumento da distribuição granulométrica quando se aumentou a concentração da fase aquosa e tensoativa em uma proporção fixa de tensoativo.

Além disso, a área interfacial em nanoemulsões é significativamente maior comparando-se à área interfacial de macroemulsões com a mesma razão fase oleosa/tensoativo. Isso porque a fase oleosa está dispersa em glóbulos menores, fazendo com que a área interfacial total da fase dispersa seja maior e com isso é necessária uma quantidade de tensoativo mínima capaz de formar um filme interfacial adequado.

5.5 Avaliação da estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, e sim auxiliar na triagem das formulações (ANVISA, 2006).

O teste de centrifugação aumenta a força gravitacional atuante sobre os glóbulos e ocasiona o aumento do número de colisões entre estes, o que pode acarretar em cremeação ou sedimentação permitindo a previsão da estabilidade do sistema disperso (BECHER, 1965).

Em nanoemulsões, o movimento browniano supera a ação da força da gravidade sobre os glóbulos, dificilmente provocando relevante alteração na estabilidade (FORGIARINI *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004). Porém em caso de relevante polidispersividade, a centrifugação pode acelerar processos de cremação, pois os glóbulos maiores tendem a migrar para a superfície. A baixa fluidez das nanoemulsões (em baixa concentração da fase oleosa) é um fator que provoca pouca resistência à colisão dos glóbulos durante a centrifugação.

Segundo Latreille e Paquin (2006), se assumirmos que a estabilidade é diretamente proporcional a força gravitacional, o comportamento em longo prazo das emulsões pode ser estimado pela centrifugação em velocidades moderadas. É aceito que a vida de prateleira em condições normais de estocagem possa ser rapidamente prevista pela observação da separação da fase dispersa devido à cremação ou coalescência quando a emulsão é exposta a este teste.

O estresse térmico permite o incremento da energia cinética do sistema, sendo possível avaliar sua susceptibilidade a este parâmetro (BECHER, 1965; SCHICK, 1989).

As **Tabelas 14 e 15** demonstram os resultados obtidos nos testes preliminares de estabilidade.

Tabela 14 - Análise macroscópica das formulações contendo óleo de maracujá após centrifugação e estresse térmico.

Formulação	Centrifugação	Estresse térmico (°C)								
		40	45	50	55	60	65	70	75	80
M6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
M7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
M8	CI	N	N	N	N	N	CL	CI	CI	SF
M9	CI	N	N	N	N	N	CL	CI	CI	SF
M10	SF	CL	CL	CL	CL	CI	SF	SF	SF	SF
M12	SF	CI	CI	CI	CI	CI	SF	SF	SF	SF
M15	SF	CI	CI	CI	CI	CI	SF	SF	SF	SF

Legenda: M: óleo de maracujá; N: normal; CL: cremação leve; CI: cremação intensa; SF: separação de fases.

Tabela 15 - Análise macroscópica das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda após centrifugação e estresse térmico.

Formulação	Centrifugação	Estresse térmico (°C)									
		40	45	50	55	60	65	70	75	80	
L1-M5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L1-M7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L1-M8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L1-M9	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L1-M11	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CI	SF	SF	SF
L1-M14	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CI	SF	SF	SF
L2-M5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L2-M8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
L2-M10	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	CI	SF
L2-M13	CI	N	N	N	N	N	N	CI	CI	SF	SF
L5-M5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF
L5-M7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF
L5-M10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF

Legenda: L: óleo de lavanda; M: óleo de maracujá; N: normal; CL: cremeação leve; CI: cremeação intensa; SF: separação de fases.

As emulsões com maior quantidade de fase oleosa e maior tamanho de glóbulo foram as que apresentaram sinais de instabilidade após centrifugação (**Tabelas 14 e 15**). Provavelmente a quantidade de tensoativo utilizada não foi suficiente para a formação de um filme interfacial estruturado em emulsões com elevada quantidade da fase oleosa.

No estresse térmico, as formulações contendo óleo de lavanda apresentaram separação de fases à 80° C, o que pode ter ocorrido devido à desestabilização do sistema pela evaporação dos seus constituintes voláteis. Sabe-se que o movimento das moléculas de um líquido aumenta com a elevação da temperatura, o que favorece a tendência das moléculas em escapar para a fase vapor, causando um conseqüente aumento da pressão de vapor (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). Os óleos essenciais possuem alta pressão de vapor, ou seja, volatilizam em baixas temperaturas.

Líquidos diferentes possuem pressões de vapor diferentes, em consequência da maior ou menor interação entre suas moléculas ([www. //educar.sc.usp.br/quimapoio](http://www.//educar.sc.usp.br/quimapoio)). Os óleos vegetais fixos possuem baixa pressão de vapor, assim, o óleo essencial de lavanda quando solubilizado com os componentes oleosos da formulação provavelmente sofreu diminuição da sua pressão de vapor.

O estresse térmico é uma ferramenta útil na análise da susceptibilidade de emulsões contendo óleos essenciais, pois estima a ocorrência de possíveis processos de instabilidade em produtos que os contém quando expostos ao calor durante seu preparo ou armazenamento (SOROKINA, DOLLIMORE, ALEXANDER, 2002). A desestabilização do sistema à 80 °C não indica, porém, que este sistema não seja estável por um longo período de tempo em temperatura ambiente.

A distribuição granulométrica das formulações que se mantiveram estáveis após os testes preliminares foi determinada e está apresentada na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Distribuição granulométrica das formulações estáveis após centrifugação e estresse térmico..

Formulações	Tamanho de glóbulo (nm)
M6	268 ± 3
M7	283 ± 3
L1-M5	38 ± 4
L1-M7	206 ± 15
L1-M8	291 ± 4
L2-M5	54 ± 3
L2-M8	204 ± 5
L5-M5	105 ± 10
L5-M7	210 ± 13
L5M10	288 ± 30

Legenda: L: óleo de lavanda; M: óleo de maracujá.

Através da determinação da distribuição granulométrica foi possível confirmar o que havia sido observado na análise microscópica, ou seja, que a presença do óleo essencial de lavanda favorece a formação de glóbulos diminutos.

Segundo, Kanei, Tamura e Kunieda (1999) a presença de moléculas de baixo peso em compostos aromáticos possuem características anfílicas e tendem a penetrar na interface tensoativa. É possível que esses compostos tenham atuado como co-tensoativos na interface do glóbulo favorecendo a formação de glóbulos muito pequenos.

Os valores de condutividade elétrica e pH foram determinados antes e após o estresse térmico, como proposto por Moraes em 2006 (**Tabelas 17 e 18**).

Tabela 17 – Valor de condutividade elétrica e de pH das formulações contendo óleo de maracujá em 48h do preparo e após estresse térmico.

Formulações	Condutividade elétrica (mS/cm)		Valor de pH	
	48h	E.T.	48h	E.T.
M6	55,0 ± 0,35	56,0 ± 0,07	6,60 ± 0,007	6,50 ± 0,02
M7	55,0 ± 0,07	54,0 ± 0,42	6,41 ± 0,007	6,38 ± 0,007

Legenda: M: óleo de maracujá; E.T: Estresse Térmico.

Tabela 18 - Valor de condutividade elétrica e de pH das formulações contendo óleo de maracujá e óleo de lavanda em 48h do preparo e após estresse térmico.

Formulações	Condutividade elétrica (mS/cm)		Valor de pH	
	48h	E.T.	48h	E.T.
L1-M5	49,4 ± 0,00	64,70 ± 0,30	6,42 ± 0,007	4,80 ± 0,020
L1-M7	48,4 ± 0,10	63,7 ± 0,23	6,48 ± 0,028	5,15 ± 0,005
L1-M8	50,5 ± 0,23	65,0 ± 0,38	6,52 ± 0,028	5,22 ± 0,005
L2-M5	51,2 ± 0,58	72,1 ± 0,51	6,14 ± 0,007	4,46 ± 0,011
L2-M8	50,1 ± 0,52	63,8 ± 0,20	6,53 ± 0,014	4,71 ± 0,005
L5-M5	54,5 ± 0,15	78,1 ± 0,20	5,21 ± 0,007	4,23 ± 0
L5-M7	51,3 ± 0,32	80,0 ± 0	5,77 ± 0,014	4,37 ± 0,005
L5M10	52,7 ± 0,28	82,0 ± 0,30	5,77 ± 0,021	4,36 ± 0,005

Legenda: L: óleo de lavanda; M: óleo de maracujá; E.T: Estresse Térmico.

Para os resultados referentes aos valores de condutividade elétrica e pH, as formulações contendo óleo de maracujá como fase oleosa não apresentaram alteração significativa após o estresse térmico. Porém naquelas constituídas de óleo de maracujá e óleo

de lavanda, a alteração destes valores foi significativa quando analisada através do test- t (valor de $p < 0,0001$ para todas as formulações analisadas), o que indica que algum componente presente no óleo essencial possa ter favorecido a ocorrência de processos de instabilidade química como oxidação ou hidrólise.

Após os estudos de caracterização e estabilidade, as emulsões L1-M5, L2-M5, L5-M5, que apresentaram os menores tamanhos de glóbulo (38 ± 4 , 54 ± 3 e 105 ± 10 respectivamente - ver **Tabela 16**) foram escolhidas para continuação do estudo.

Para facilitar a leitura, a formulação L1-M5 passou a ser chamada de F1, a formulação L2-M5 foi denominada F2 e a L5-M5 foi denominada F5, em referência a quantidade de óleo essencial contido na formulação, ou seja, F1= 1,0%, F2= 2,0% e F5= 5,0%, visto que a proporção de tensoativo e de óleo de maracujá é a mesma nas três formulações.

Após a escolha das emulsões, o método à frio passou a ser o utilizado na preparação das mesmas para minimizar a perda do óleo essencial de lavanda.

Neste método, os tensoativos foram homogeneizados na fase oleosa por agitação manual durante cinco minutos e a fase aquosa lentamente adicionada na oleosa. Através deste método foi possível a obtenção de nanoemulsões com tamanho de glóbulo reduzido, ainda que maior do que o tamanho de glóbulo obtido pelo método utilizando aquecimento a $75 \pm 2^\circ\text{C}$.

Acredita-se que com a elevação da temperatura aconteça a redução da viscosidade da fase oleosa e conseqüentemente a diminuição das forças de coesão entre as moléculas, facilitando a solubilização do óleo no tensoativo, o que predispõe a formação de glóbulos de pequeno diâmetro (MORALES *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006). Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Liu e colaboradores (2006) que em seus experimentos utilizando óleo mineral e o par de tensoativos polisorbato 80 e monooleato de sorbitano

observou que houve a diminuição no tamanho dos glóbulos de 120 para 74 nm quando a temperatura de preparo das emulsões aumentou de 30 para 50°C.

A temperatura, portanto, é um parâmetro relevante no controle da granulometria do sistema, mas não determinante na obtenção das nanoemulsões visto que no método à frio as emulsões F1, F2 e F5 apresentaram tamanhos de glóbulos: 161 ± 5 , 177 ± 10 e 225 ± 13 respectivamente.

5.6 Testes de estabilidade acelerada (TEA)

As nanoemulsões F1, F2 e F5 conforme descrito anteriormente foram submetidas às temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 60 dias. Quanto ao aspecto macroscópico, as formulações submetidas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram ausência de cremeação ou separação de fases no período do experimento. Cremeação leve foi observada nas formulações F2 e F5 em 20 dias a $45 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo que em 40 dias a emulsão F5 apresentou separação de fases. Segundo a ANVISA (2006) a emulsão é considerada estável quando não apresenta processos de cremeação intensa ou separação de fases quando acondicionada a esta temperatura no período de 30 dias. Os valores referentes à condutividade elétrica e pH, bem como potencial zeta e tamanho de glóbulos das amostras estão apresentados nas **Figuras 7, 8, 9 e 10** respectivamente.

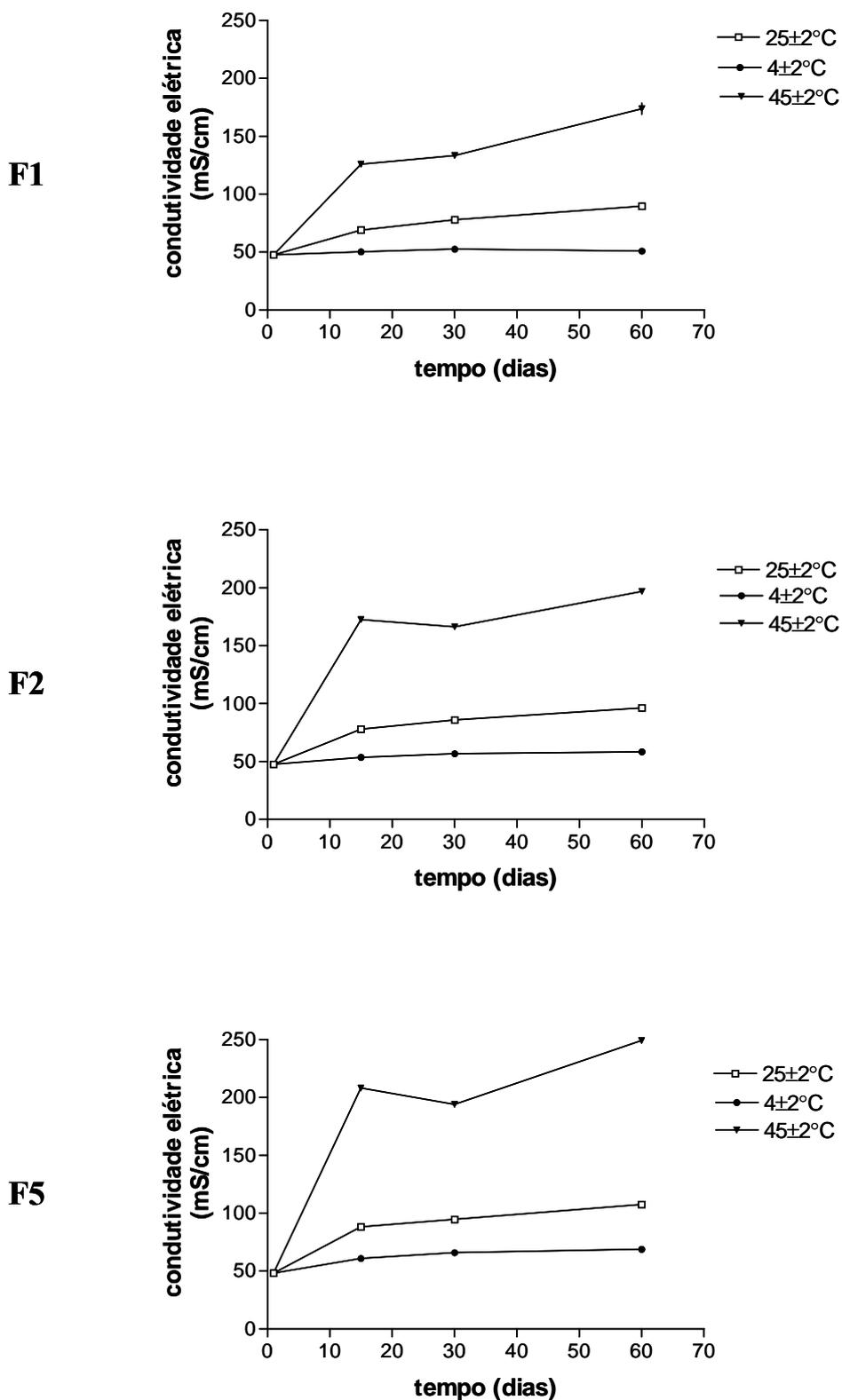


Figura 7 - Valor de condutividade elétrica (mS/cm) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ no período de 60 dias.

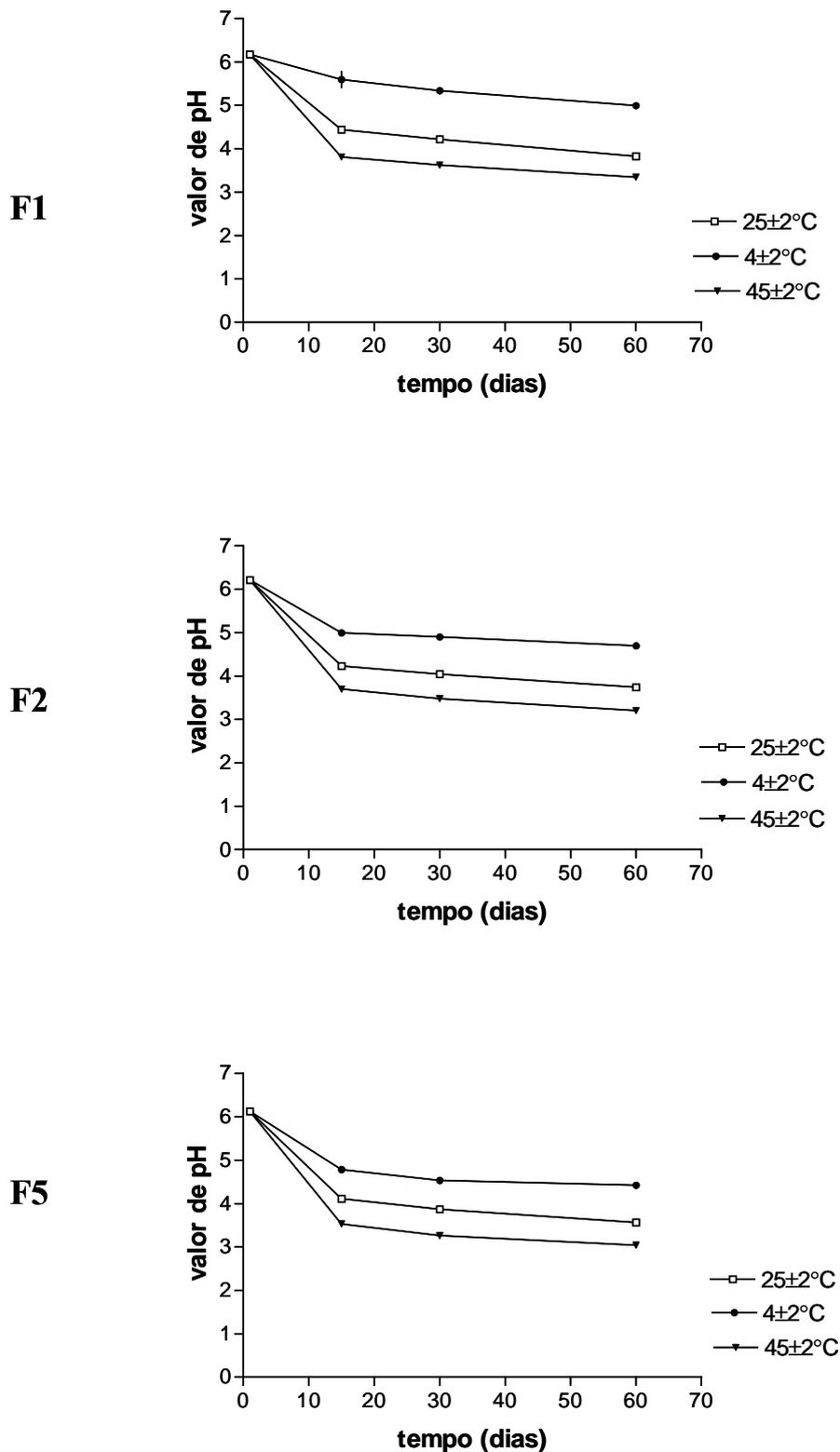


Figura 8 - Valor de pH apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias.

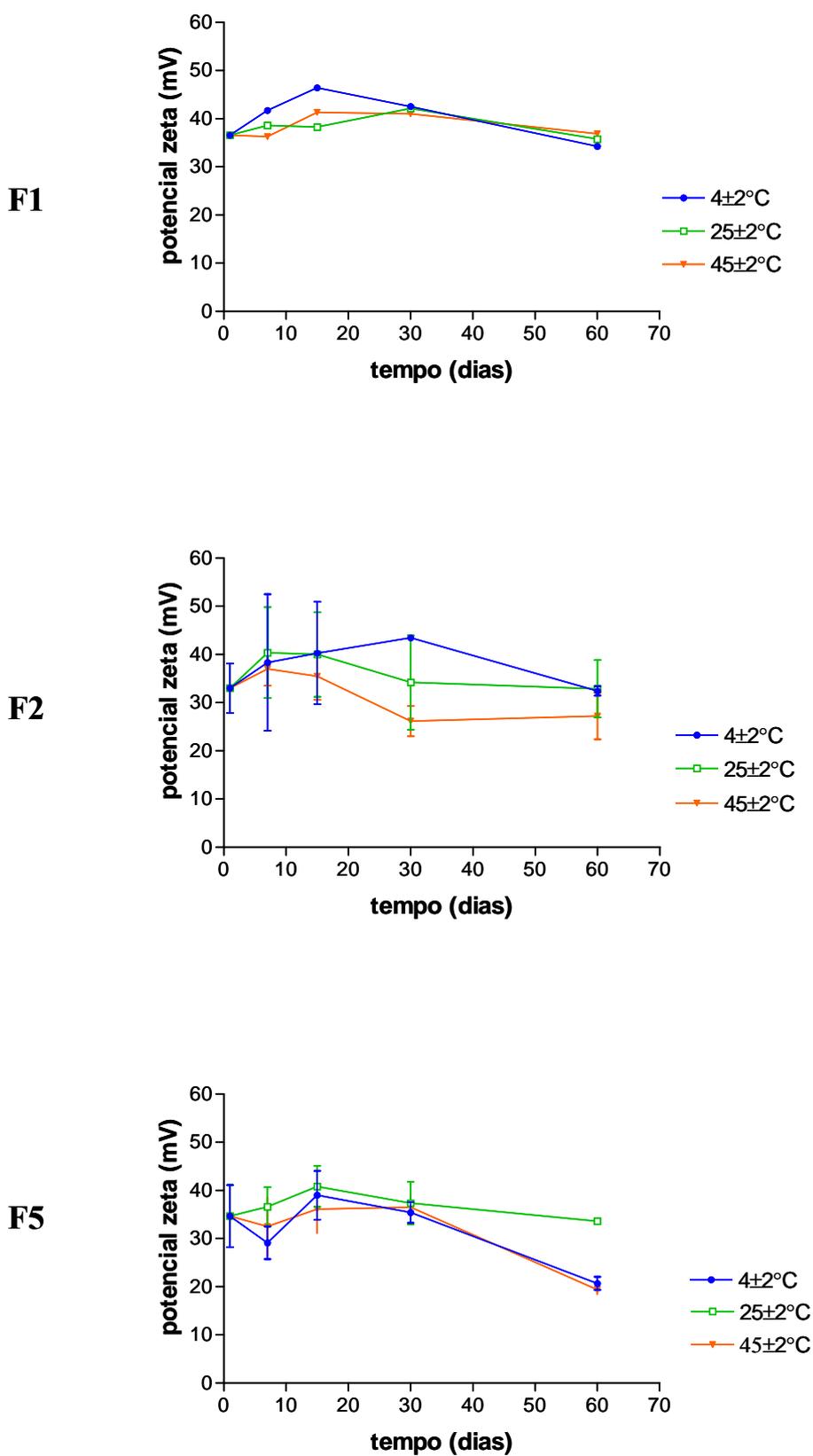


Figura 9 – Valor de potencial zeta (em módulo) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ no período de 60 dias.

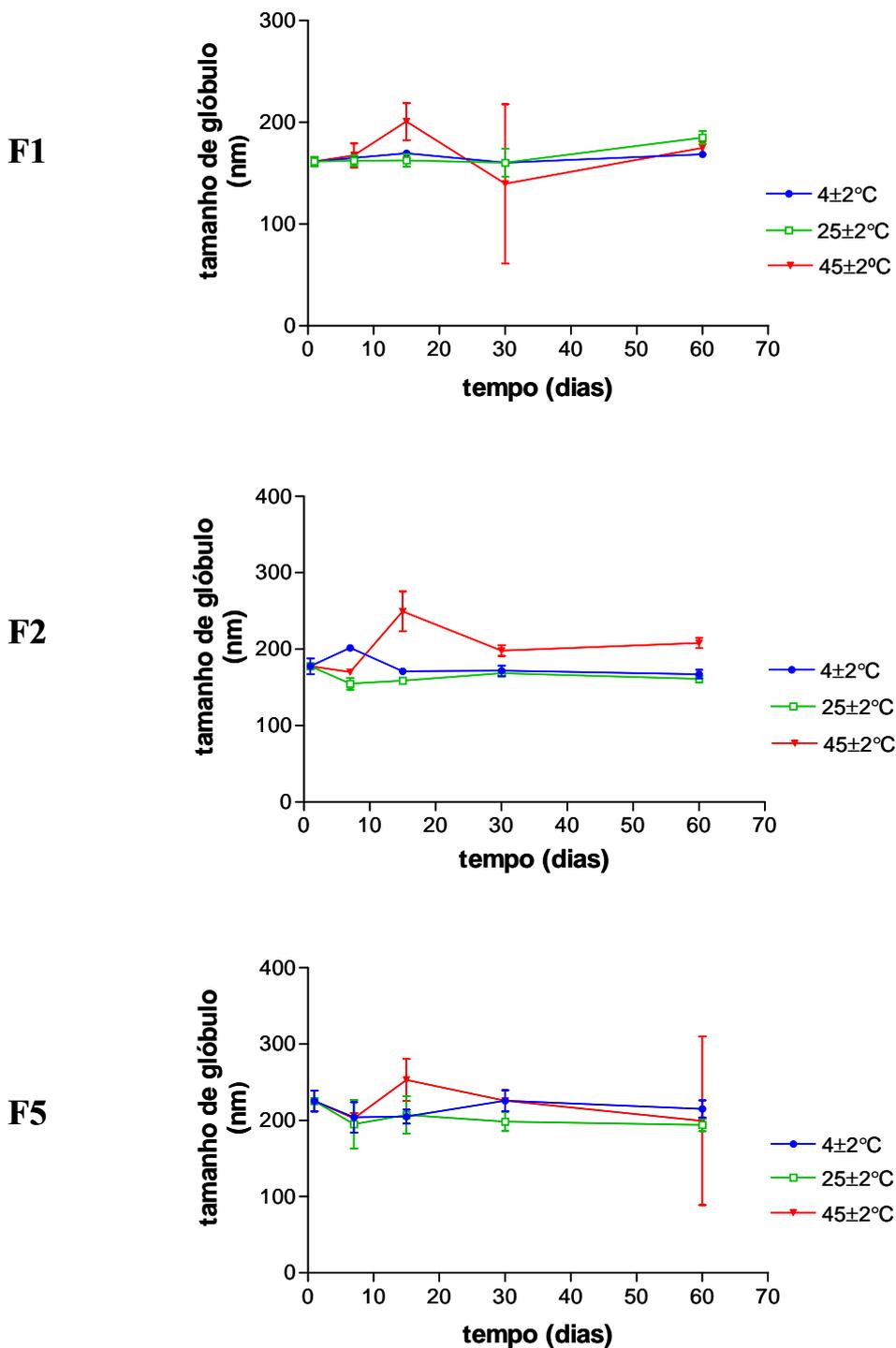


Figura 10 – Tamanho de glóbulos (nm) apresentado pelas emulsões F1, F2 e F5 quando armazenadas a 25 ±2°C, 4 ±2°C e 45 ±2°C no período de 60 dias.

Os valores de condutividade elétrica e valor de pH foram significativamente alterados em todas as condições de armazenamento para as formulações F1 ($p < 0,0001$), F2 ($p < 0,0001$) e F5 ($p < 0,0001$). Observou-se ainda que esta alteração foi maior quanto mais elevada foi a temperatura a que a amostra foi submetida.

O aumento nos valores de condutividade elétrica foi diretamente proporcional à quantidade de óleo essencial contida na formulação, o que não é um resultado esperado já que quanto maior é a quantidade de óleo menor é a tendência da dispersão em conduzir corrente elétrica. Acredita-se, entretanto que este fato deva-se à ocorrência de processos de instabilidade química como hidrólise, por exemplo, que poderia estar provocando a liberação de íons no meio aquoso, aumentando a condução de corrente elétrica.

O valor do pH é um parâmetro de monitoramento da estabilidade em emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, uma diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres reduzem o pH das formulações, sendo empregados como indicadores de estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento (MARTINI, 2005).

O acetato de linalila é um éster encontrado em grande quantidade no óleo essencial de lavanda sendo passível a hidrólise quando em formulações com alta concentração de água (SILVA, 1998).

Apesar da possibilidade da ocorrência de oxidação devido à composição rica em compostos insaturados (óleo de maracujá com aproximadamente 68,70% de ácido linoléico (PONTES, 1989; SANT'ANNA, TÔRRES, PORTO, 2001) e óleo de lavanda contendo como majoritário o linalol, que também apresenta insaturação, acredita-se que a alteração nos

valores de pH e condutividade elétrica tenha sido causada por hidrólise, já que foi utilizado o antioxidante BHT.

Acredita-se que a hidrólise seja causada por componentes presentes no óleo essencial, visto que no teste de estabilidade preliminar as emulsões não adicionadas deste óleo não apresentaram significativa alteração e que em inúmeros estudos realizados com óleos vegetais como o óleo de canola (SANTOS, 2006), urucum e café (MORAIS, 2006) a alteração nesses valores não foi significativa.

Outro método utilizado para determinar a estabilidade de um sistema disperso é a medida da magnitude do potencial zeta. O potencial zeta é definido como a diferença de potencial entre a superfície de íons fortemente ligados ao redor da partícula e uma região neutra (não-carregada) da solução. Quanto maior é a repulsão de cargas entre dois glóbulos próximos, menor a sua interação e, portanto, menor tendência à floculação e coalescência (ROLAND *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2006b). Assim, valores iguais ou maiores que 30 mV (em módulo) indicam que a força repulsiva da dupla camada iônica é maior do que a força atrativa de van der Waals, e garantem uma estabilidade eletrostática razoável da emulsão (JEONG, OH, KIM, 2001; ROLAND *et al.*, 2003).

Segundo a literatura o potencial zeta deve ser considerado, porém não é crítico para emulsões formuladas utilizando tensoativos não-iônico pela maior influência do componente estérico, devido à carga eletrônica não significativa e ao tamanho ocupado pelos grupos polares na interface (TADROS *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2006b).

Ainda assim, através dos valores obtidos, pode-se sugerir que a estabilização eletrostática seria suficiente para manter a repulsão dos glóbulos evitando processos de instabilidade, visto que a diminuição do seu valor foi menor que 30 mV apenas em F2 à 45 ±2°C em 30 dias e F5 à 4±2°C e 45±2°C em 60 dias.

A medida no tamanho de glóbulos é um dado importante na análise da estabilidade, afinal quanto mais rápido é o aumento no tamanho de glóbulos, mais rapidamente ocorrerão processos de instabilidade como cremeação ou separação de fases (JEONG, OH, KIM, 2001).

Não houve variação relevante da granulometria do sistema em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e em geladeira ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante o período de experimento. Em estufa, a alteração no tamanho de glóbulos foi mais relevante, bem como a polidispersividade, o que é um resultado esperado já que a temperatura aumenta a energia cinética do sistema, aumentando a possibilidade de processos de instabilidade. Além disso, a fase oleosa sendo constituída por óleo volátil pode ter provocado ruptura da interface pela evaporação de suas moléculas.

É importante ressaltar que o método utilizado (light scattering) não distingue glóbulos floculados. Desta maneira foi observado em todas as formulações um aumento no tamanho de glóbulos em 15 dias e posterior redução nos tempos subsequente. Acredita-se que neste período o sistema possa ter apresentado floculação e posteriormente defloculação.

5.7 Avaliação dos constituintes do óleo essencial de lavanda nas nanoemulsões após TEA por CG/MS

O óleo de lavanda foi extraído das nanoemulsões submetidas ao TEA por Clevenger. O período de 3 horas foi padronizado para a extração, pois foi o tempo em que ocorreu a maior recuperação do óleo essencial.

A quantificação e identificação dos seus componentes majoritários foram realizadas através do CG/MS. A **Tabela 19** apresenta os componentes encontrados no óleo de lavanda antes de ser veiculado nas nanoemulsões e após serem extraídos de nanoemulsões submetidas às temperaturas de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 dias.

A **Tabela 20** apresenta os índices de Kovat's (IK) obtidos desse estudo, o IK encontrado na literatura (ADAMS, 1995; MONDELLO, 2002) e o índice de similaridade entre os espectros de massa obtidos quando comparado aos dados da biblioteca Wiley 7[®].

Tabela 19 - Porcentagem dos componentes encontrados no óleo essencial de lavanda antes de ser veiculado em nanoemulsões (1º dia) e após ser extraído de nanoemulsões submetidas à geladeira ($4\pm 2^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e estufa ($45\pm 2^\circ\text{C}$) durante 60 dias.

Condição	Componentes (%)								
	1,8- cineol	β -ocimene	linalol	cânfora	borneol	acetato de linalila	β -cariofileno	α -terpineol	gerandiol
1 dia/ 25 \pm 2°C	3,69	1,33	37,40	3,05	2,60	45,14	1,44	0,30	0,10
60 dias/ 4 \pm 2°C	3,20	2,78	54,54	3,14	2,66	16,10	1,64	5,65	1,56
60 dias/ 25 \pm 2°C	3,67	3,11	53,50	3,24	2,55	16,10	1,53	5,62	2,21
60 dias/ 45 \pm 2°C	2,93	2,35	50,98	3,23	2,93	5,00	1,71	12,44	3,21

Tabela 20 - Índice de Kovat's obtido, Índice de Kovat's encontrado na literatura e Índice de Similaridade dos compostos majoritários do óleo de lavanda.

	1,8- cineol	β -ocimene	linalol	cânfora	borneol	acetato de linalila	β -cariofileno	α -terpineol	gerandiol
IK encontrado	1030	1043	1101	1145	1170	1249	1414	1193	1248
IK da literatura	1033	1040	1098	1143	1165	-	1418	1189	1250
Índice de Similaridade	97	97	98	97	98	98	95	95	98

Legenda: **IK**: Índice de Kovat's

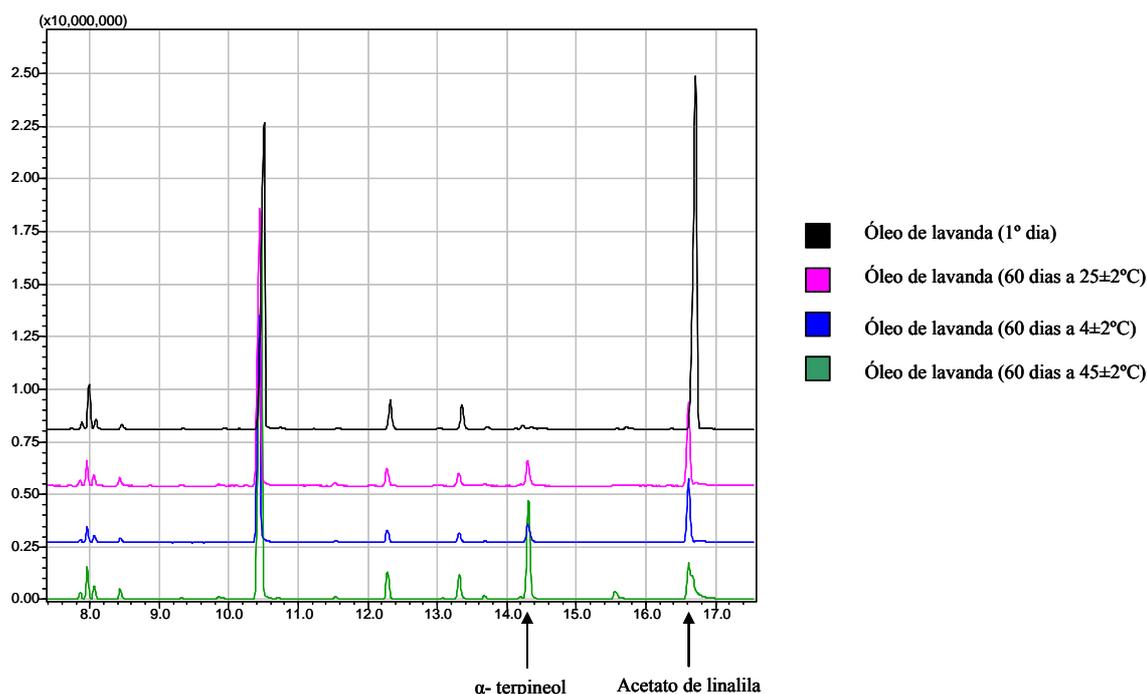


Figura 11 - Parte do Cromatograma realizado para o óleo de lavanda (1º dia e após 60 dias a 25±2°C, 4±2°C e 45±2°C).

Entre os compostos encontrados no óleo essencial de lavanda, o acetato de linalila apresentou redução relevante em porcentagem após ser submetido ao teste de estabilidade acelerada. Em estufa esta redução foi de 88,93%, o que indica que este composto pode ter volatilizado ou sofrido hidrólise ou reações químicas com outros compostos presentes na formulação. O acetato de linalila é um éster é passível à hidrólise quando em meio contendo elevada quantidade de fase aquosa. Além da significativa redução em sua quantidade, os compostos linalol, α -terpineol e geraniol apresentam-se em maior quantidade após o TEA, sendo que o α -terpineol e o geraniol tiveram aumento em concentração principalmente quando armazenados em estufa. É possível que esses compostos sejam subprodutos das reações químicas envolvidas com o acetato de linalila.

A possível hidrólise deste composto pode se relacionar com a redução dos valores de pH observados nas formulações submetidas ao TEA.

5.8 Determinação do Ponto de Turvação (Cloud Point) do tensoativo hidrofílico

A turbidez da solução a 1,0% do tensoativo hidrofílico *PEG-30 castor oil* foi determinada à $80 \pm 2^\circ\text{C}$.

O Cloud Point ou ponto de turbidez está relacionado à mudança no valor de EHL do tensoativo conforme o aumento da temperatura. Isso acontece, pois com o aumento da temperatura há a gradativa desidratação das moléculas de óxido de etileno, responsáveis pela característica hidrofílica do tensoativo, sendo que em determinada temperatura o tensoativo torna-se lipofílico, formando micelas invertidas, causando a turbidez da solução (MARSZAL, 1987).

A determinação do Cloud Point é complementar a determinação da temperatura de inversão de fases, não considerando, porém, a influência dos outros componentes presentes na formulação que influenciam na afinidade hidro-lipofílica do mesmo, como a constituição da fase oleosa e sua porcentagem na formulação, presença de eletrólitos, etc (SALAGER *et al.*, 2003).

5.9 Determinação da temperatura de inversão de fases (PIT)

A inversão de fases de uma emulsão pode ser detectada pela medida da condutividade elétrica, sendo que o valor decresce bruscamente quando a emulsão inverte de O/A para A/O.

Os valores de condutividade elétrica M6, M7, M10, F1, F2 e F5, estão apresentados na

Figura 12.

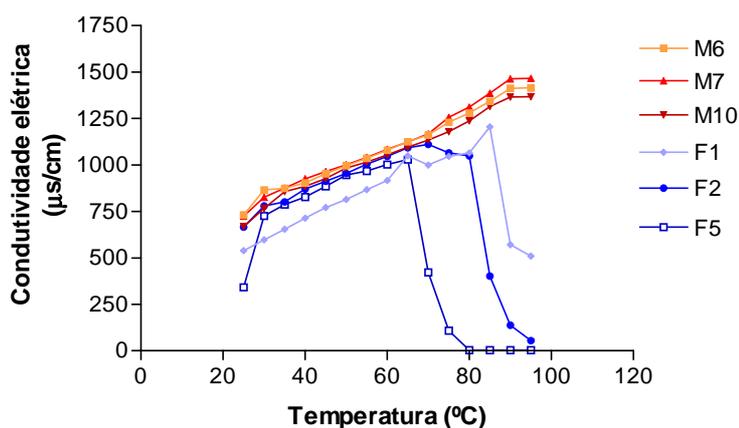


Figura 12 - Valor de condutividade elétrica versus temperatura (°C) das formulações M6, M7, M10, F1, F2 e F5.

A diminuição brusca nos valores de condutividade elétrica apresentadas nas emulsões F1, F2 e F5 sugere a ocorrência da inversão de fases pela temperatura (PIT).

Observou-se que a queda da condutividade elétrica ocorreu em temperaturas menores conforme maior foi a porcentagem do óleo essencial contida na formulação. A formulação F1 apresentou redução no valor de condutividade elétrica de 1205 para 571 $\mu\text{s}/\text{cm}$ entre 85 a 90 °C. Em F2 o valor de condutividade elétrica passou de 1049 a 402 $\mu\text{s}/\text{cm}$ entre 80 a 85 °C atingindo 54 $\mu\text{s}/\text{cm}$ na temperatura de 95 °C, sendo que F5 apresentou redução de 1029 a 422 $\mu\text{s}/\text{cm}$ entre 65 e 70°C chegando a 3 $\mu\text{s}/\text{cm}$ a 80 °C.

Nas formulações contendo óleo de maracujá como fase oleosa não houve qualquer decréscimo nos valores de condutividade elétrica, o que indica que o PIT para este sistema ocorre acima da temperatura avaliada pelo experimento.

Sabe-se que a temperatura na qual ocorre a inversão de fases da emulsão, possui grande correlação quanto ao tipo de fase oleosa empregada. Estudos realizados por Kanei, Tamura e Kunieda (1999), sugerem que a temperatura de inversão de fases é menor em sistemas na qual a fase oleosa é constituída por alguns compostos alifáticos. Segundo os autores, algumas dessas moléculas, principalmente de baixo peso molecular e contendo

grupos polares têm propriedades anfífilas podendo penetrar e adsorver na interface do glóbulo. A curvatura do tensoativo na temperatura de inversão de fases é zero, ou seja, as características lipofílicas e hidrofílicas tendem a ser balanceadas na interface durante este evento. Os autores sugerem que moléculas alifáticas podem penetrar na interface fazendo a curvatura do tensoativo ser negativa, assim, o tensoativo precisa ser mais hidrofílico para manter a curvatura zero na temperatura de inversão de fases. Por esse motivo a presença desses componentes pode baixar o PIT, sendo que a sua localização, ou seja, se ele está penetrando na interface ou dentro do glóbulo é importante no estudo do PIT para esses sistemas.

Esse estudo sugere ainda que quando comparado o PIT em formulações contendo dois hidrocarbonetos de mesmo peso molecular, um saturado e outro insaturado, a temperatura de inversão de fases foi mais baixa no que apresentava insaturação. Observou também que a inversão de fases aconteceu anteriormente naqueles que apresentavam função álcool quando comparados àqueles com função cetona ou aldeído (KANEI, TAMURA, KUNIEDA, 1999), talvez pelo fato de que essas moléculas podem sofrer desidratação conforme a mudança de temperatura mais facilmente.

O álcool linalol sendo um dos componentes majoritários do óleo essencial de lavanda, pode ter provocado a diminuição do PIT, fazendo com que a inversão de fases ocorresse em temperaturas mais baixas do que quando a fase oleosa é composta somente pelo óleo de maracujá.

Sabendo que as formulações quando preparadas pelo método descrito em 4.2.1.1 utiliza aquecimento a $75 \pm 5^\circ \text{C}$, a possibilidade de ocorrência do PIT existe apenas para a emulsão F5, sendo que nas demais formulações estudadas o único processo de inversão de fases envolvido é a inversão de fases pela mudança da fração volumétrica (EPI).

5.10 Influência das variáveis do processo de obtenção de nanoemulsões

5.10.1 Influência da quantidade de tensoativo

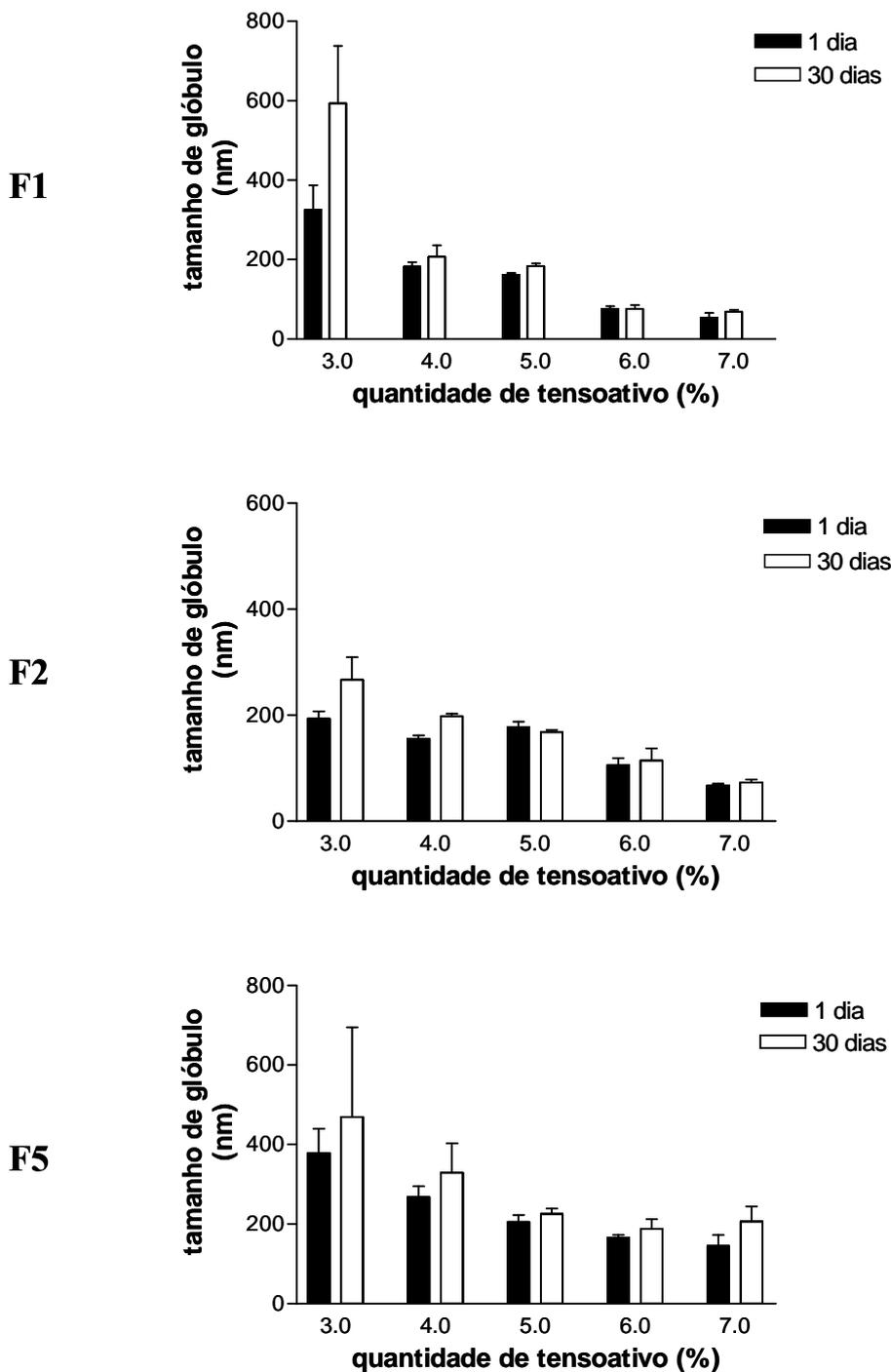


Figura 13 - Tamanho de glóbulos (nm) das emulsões F1, F2 e F5 com diferentes quantidades de tensoativos em 24 horas do preparo (1dia) e 30 dias.

Em todas as formulações estudadas houve um decréscimo na distribuição granulométrica com o aumento da quantidade de tensoativos utilizada. Na quantidade de 3,0% e 4,0 % as formulações apresentaram-se mais polidispersas e com maior tamanho de glóbulo. Esses resultados encontram-se de acordo com relatados por Fernandez e colaboradores (2004) que sugerem que existe uma concentração mínima de tensoativo para formar nanoemulsões estáveis e que quanto maior o índice de polidispersividade mais rapidamente acontecerão processos de instabilidade como, por exemplo, o aumento no diâmetro de glóbulos. O aumento no tamanho de glóbulos após 30 dias foi significativo em F1 com 3,0% de tensoativo (test-t, $p=0,0142$) e em F2 com 4,0% de tensoativo (test-t, $p=0,003$).

A formulação F5 contendo 7,0% de tensoativo também apresentou significativo aumento no tamanho de glóbulo (test t, $p=0,0384$) no período analisado. Em sistemas com excesso de tensoativos, há maior formação de micelas, que podem facilitar o transporte de moléculas de óleo dos glóbulos menores para os maiores, podendo resultar num aumento da granulometria em função do tempo.

O processo “Ostwald ripening”, como é conhecido este fenômeno, é resultante da diferença de solubilidade entre os glóbulos, pois quanto maior a curvatura interfacial do glóbulo em dispersão, maior a área de superfície da fase dispersa e maior a solubilidade na fase dispersante. Este fator pode causar a movimentação de moléculas de óleo através de difusão passiva ou transporte sustentado por micelas, provocando alteração da granulometria da fase dispersa (SONNVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004; CAPEK, 2004).

5.10.2 Influência da velocidade de agitação

As emulsões foram manipuladas pelo método a frio descrito em 4.4.1.2 e submetidas a diferentes velocidades de agitação: 600, 8.000 e 9.500 rpm por 5 minutos. A determinação granulométrica encontra-se na **Figura 14**.

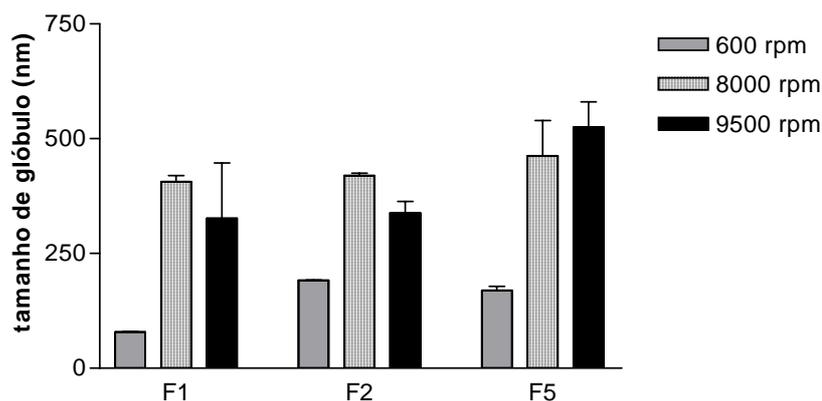


Figura 14 - Distribuição granulométrica das emulsões F1, F2 e F5 após serem submetidas a 600, 8.000 e 9.500 rpm durante 5 minutos.

A velocidade de agitação demonstrou ser um parâmetro crítico para este sistema, sendo que a velocidade de 600 rpm foi a que proporcionou a formação das dispersões com os menores tamanhos de glóbulos. Observou-se que as amostras tornaram-se mais polidispersas nas velocidades de agitação de 8.000 e 9.500 rpm (Apêndices A e B).

O processo de emulsificação é complexo e envolve inúmeros fenômenos que ocorrem simultaneamente, como a formação da fase dispersa, adsorção dos agentes tensoativos e colisão dos glóbulos formados, o que pode ou não resultar em coalescência. Cada um destes eventos ocorre inúmeras vezes durante a emulsificação, o que mostra que este processo é dinâmico (TADROS *et al.*, 2004).

Durante o processo de agitação inicial os glóbulos da fase dispersa são formados, no entanto a medida que a agitação continua a probabilidade de colisão entre os mesmos aumenta e a coalescência pode ocorrer (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004). É impossível, porém prever o tempo e a velocidade de agitação que predispõe a formação e estabilização das gotículas formadas, sendo geralmente determinado empiricamente. As razões para que o fenômeno de estabilização das gotículas seja dependente do tempo e da velocidade de agitação podem ser atribuídas à distribuição do emulgente entre as fases, a formação lenta do filme interfacial sobre os glóbulos ou à interrupção da formação

do filme por agitação contínua (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). No caso de nanoemulsões a velocidade de agitação é um parâmetro ainda mais crítico, devido a alta fluidez natural do sistema que não impõe barreiras a colisão, diferente das emulsões clássicas, que geralmente apresentam maior viscosidade.

Solé e colaboradores (2006) observaram que a emulsificação por alta energia utilizando Ultra Turrax e ultra-som, produz emulsões com tamanho de glóbulo superior às preparadas pelo método de EPI, em sistema composto por oleato de potássio - ácido oléico - C₁₂E₁₀ / hexadecano. Neste mesmo experimento constataram que as nanoemulsões com glóbulos menores são formadas por alta velocidade de agitação desde que a fase aquosa seja adicionada lentamente. Isto pode ser interpretado devido ao fato da alta velocidade de agitação facilitar a completa solubilização do óleo durante o processo de emulsificação (FORGIANINI *et al.*, 2001, MORALES *et al.*, 2003; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

5.10.3 Influência da adição de eletrólitos

O tampão Na₂HPO₄/ ácido cítrico foi utilizado no valor de pH=6,0 como fase aquosa das emulsões, no intuito de minimizar variações no valor de pH durante o período de armazenamento.

Os valores de pH foram medidos em 1, 7 e 30 dias, sendo que as médias obtidas estão apresentadas na **Tabela 21**, com exceção da formulação F5 que após 30 dias a 45±2°C apresentou separação de fases.

Tabela 21 - Valores de pH de F1, F2 e F5 quando submetidas a diferentes temperaturas por 1, 7 e 30 dias.

Formulação	Valor de pH					
	(25±2°C)			(45±2°C)		
	1 dia	7 dias	30 dias	1 dia	7 dias	30 dias
F1	5,97 ± 0,0058	5,98 ± 0,0058	5,95 ± 0,0058	5,97 ± 0,0058	5,92 ± 0,0058	5,77± 0,023
F2	5,97 ± 0,0058	5,97 ± 0,0058	5,96 ± 0	5,97 ± 0,0058	5,90 ± 0,0058	5,80± 0,010
F5	5,96 ± 0	5,96 ± 0,0058	5,96 ± 0,0058	5,96 ± 0	5,84 ± 0,021	-

Legenda: - : não realizado.

A adição de eletrólitos manteve o valor de pH estável (sem alterações significativas), porém influenciou na instabilidade física das nanoemulsões quando submetidas ao estresse térmico, conforme apresentado na tabela seguinte:

Tabela 22 - Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico.

Formulação	Centrifugação	Estresse térmico (°C)								
		40	45	50	55	60	65	70	75	80
F1	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF	SF
F2	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF	SF
F5	N	N	N	N	N	N	SF	SF	SF	SF

Legenda: N: normal; CL: cremeação leve ; CI: cremeação intensa; SF: separação de fases.

A estabilização de emulsões utilizando tensoativos não iônicos ocorre principalmente via mecanismo estérico, porém possíveis influências no potencial elétrico interfacial podem alterar a estabilidade de uma emulsão O/A. A estabilização eletrostérica aumenta quando a estérica e eletrostática ocorrem em paralelo (BECHER, SCHICK, 1987; MORAIS *et al.*, 2006b).

O potencial zeta é uma ferramenta para estimar a estabilidade de emulsões já que determina a repulsão eletrostática entre os glóbulos (FRIGBERG, 1988; KULMYRZAEV, SCHUBERT, 2004; ZETA-METER INC., 2005).

A estabilização eletrostática é muito sensível à carga iônica da solução contínua próxima à interface. Assim quando a concentração de eletrólitos aumenta, a dupla camada iônica é comprimida devido a forças de atração iônica, resultando na diminuição de sua espessura e diminuindo a extensão da força de repulsão eletrostática. Uma redução no potencial elétrico da dupla camada causa a redução no potencial elétrico total, comprometendo a estabilidade da emulsão (JEONG *et al.*, 2001; KULMYRZAEV *et al.*, 2003; MORAIS, 2006b).

O valor de pH está relacionado à dissociação dos íons e conseqüentemente à interação destes com a região eletronicamente carregada da interface dos glóbulos (KULMYRZAEV *et al.*, 2003; ZETA-METER INC., 2005).

Estudos demonstram que cátions bivalentes e trivalentes são mais rapidamente absorvidos na interface e, portanto sua influência no valor de potencial zeta parece ser maior do que a causada por cátions monovalentes (STACHURSKI, MICHALEK, 1996; MORAIS *et al.*, 2006b).

As médias dos valores de potencial zeta obtidos após 24h da manipulação para F1, F2 e F5 foram respectivamente: $-37,6 \pm 10,22$, $38,33 \pm 0,85$ e $-27,76 \pm 1,105$.

O valor de potencial zeta determinado em F5, sendo menor do que o valor mínimo considerado para uma estabilidade razoável (30 mV) reforça a teoria de que a carga elétrica pode influenciar sobremaneira a estabilidade de emulsões O/A formuladas com tensoativos não iônicos, mesmo a estabilidade eletrostática não sendo o principal mecanismo de envolvido nesses sistemas.

5.10.4 Influência da adição de silicones

As nanoemulsões F1, F2 e F5 foram adicionadas dos silicones: carbinol 5562[®], 245 Fluid[®] e 190 Fluid[®]. A adição de carbinol 5562[®] em todas as formulações provocou a desestabilização do sistema, que apresentou cremeação quando analisado macroscopicamente após 24h (estabilidade intrínseca). Os resultados dos testes preliminares de estabilidade estão apresentados na **Tabela 23**:

Tabela 23 - Análise macroscópica das formulações adicionadas de silicones após centrifugação e estresse térmico.

Formulação	Centrifugação	Estresse térmico (°C)								
		40	45	50	55	60	65	70	75	80
F1-carb	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
F1-245	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
F1-190	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2-carb	CL	N	N	N	N	N	N	N	CI	SF
F2-245	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF
F2-190	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CI
F5-carb	CL	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF
F5-245	CL	N	N	N	N	N	N	N	SF	SF
F5-190	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SF

Legenda: carb: carbinol 5562[®], 245: 245 Fluid[®], 190: 190 Fluid[®], N: normal; CL: leve cremeação; CI: cremeação intensa; SF: separação de fases.

Silicones diferem dos compostos orgânicos por possuírem forças intermoleculares atrativas muito fracas. São constituídos por cadeias Si-O-Si que se organizam estruturalmente ocupando mais espaço que cadeias C-O-C ou C-C (POLYMER HANDBOOK, 1989) Apesar de muitos silicones possuírem grupos polares ou apolares em suas cadeias tornando-se mais hidro ou lipossolúveis, a sua estrutura básica não é solúvel em água e em muitos solventes apolares, formando, portanto uma terceira fase (O'LENICK, 2000). Acredita-se que essas características dos silicones podem ter dificultado o processo de emulsificação, tanto pela sua solubilidade diferenciada, quanto pelo tamanho da sua molécula.

Conforme observado no estresse térmico (**Tabela 23**) as formulações adicionadas de carbinol 5562[®] e 245 Fluid[®] apresentaram sinais de instabilidade em temperatura menor do que as formuladas com o 190 Fluid[®]. Na centrifugação o único silicone que não provocou nenhum processo de instabilidade em nenhuma das formulações analisadas foi o 190 Fluid[®]. Isto pode ter ocorrido, pois o 190 Fluid[®] é hidrofílico e, portanto foi solubilizado na fase aquosa. Já os silicones carbinol 5562[®] e 245 Fluid[®] são lipofílicos. Possivelmente a quantidade de tensoativo utilizada não tenha sido suficiente para emulsificar a fase oleosa, ou

ainda sua estrutura estérica (molécula de cadeia longa) possa ter interferido na formação do filme interfacial, alterando as interações intermoleculares das cadeias tensoativas com a fase oleosa. No estresse térmico, a 75 ± 2 °C a formulação F5 contendo o silicone 245 Fluid® apresentou separação de fases. Possivelmente a volatilidade deste silicone que pode ter resultado no rompimento da interface do glóbulo causando separação de fases. Os tamanhos de glóbulos das emulsões que apresentaram estabilidade intrínseca adequada foram determinados em 24h e após 30 dias em temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

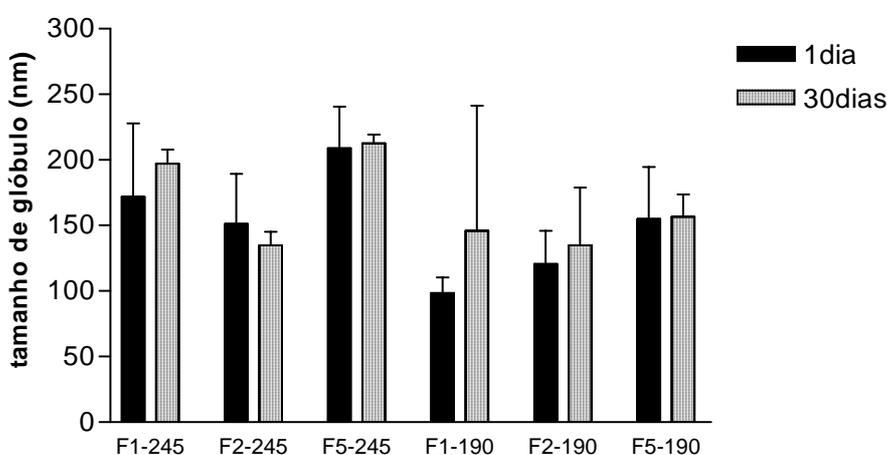


Figura 15 - Distribuição granulométrica das emulsões F1, F2 e F5 adicionadas dos silicones 245 Fluid® e 190 Fluid®.

A diferença no tamanho de glóbulos neste período não foi considerada estatisticamente significativa (test-t).

5.11 Avaliação da atividade antiinflamatória tópica das nanoemulsões

5.11.1 Medida da irradiância da lâmpada UV e cálculo do tempo de exposição

A média da irradiação encontrada foi de $1,641 \times 10^{-4}$ W cm⁻² para exposição UVB.

Conforme descrito anteriormente foi utilizada duas vezes a Dose Eritematogênica Mínima (DEM) (MARQUELE-OLIVEIRA, 2007), o que correspondeu a 19 minutos de irradiação.

5.11.2 Avaliação do potencial antiinflamatório

A exposição aguda da pele à radiação UV determina uma resposta inflamatória imediata cujo efeito visível é o eritema (AFAQ, ADHAMI, MUKHTAR, 2005). As mudanças histológicas que seguem este evento incluem o aumento da espessura do estrato córneo, epiderme e derme, edema intercelular e perivascular na derme, migração de células pró-inflamatórias na área lesada e dor.

A avaliação do eritema cutâneo através do aparelho Chroma meter Minolta® já havia sido mensurada como método de análise inflamatória em estudos anteriores (CHAN, PO, 1991; PROKSCH *et al.*, 2005; MARQUELE- OLIVEIRA, 2007).

A evolução do eritema foi avaliada em cada animal dos grupos: grupo 1 - controle negativo; grupo 2 - recebeu tratamento com emulsão base sem o ativo; grupo 3 - recebeu tratamento com a emulsão contendo 5,0% do óleo essencial de lavanda; grupo 4 - recebeu tratamento com o óleo essencial puro.

A diferença nos valores de (a) que expressa vermelhidão cutânea estão apresentada na **Figura 16** e os valores de (a) encontrados antes da irradiação e após 2, 5, 10, 24, 48 e 72 horas na **Figura 17**:

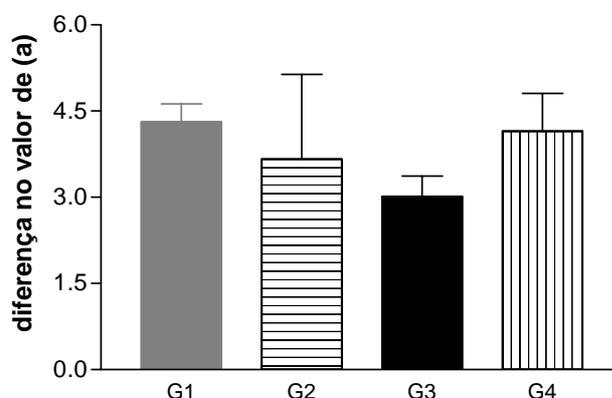


Figura 16 – Diferença no valor de (a) obtida dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2), grupo 3 (G3), grupo 4 (G4).

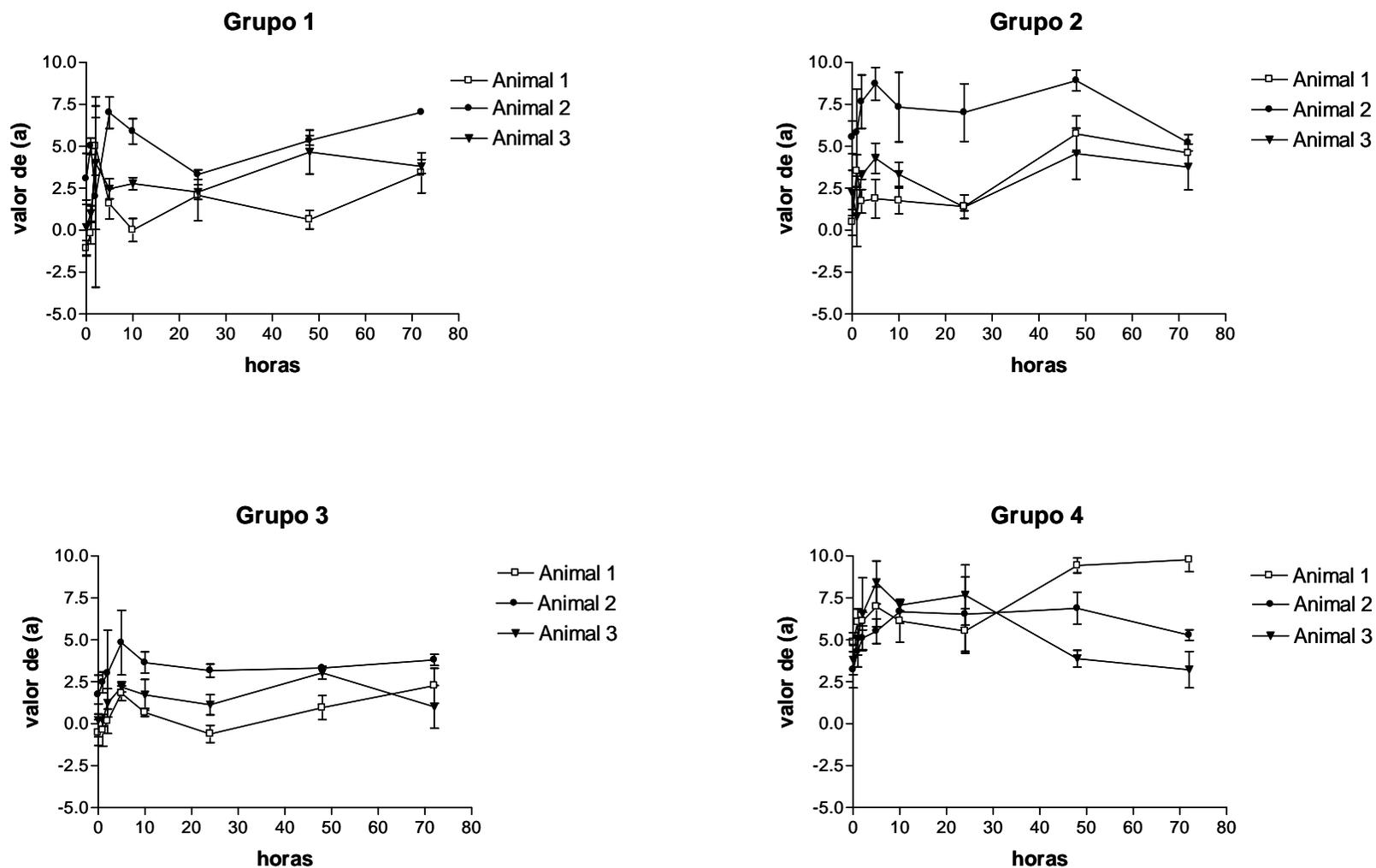


Figura 17 – Valores de (a) apresentado pelos animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 antes da irradiação e após 2, 5, 10, 24, 48, 72 horas da irradiação.

Foi observada grande intensidade no eritema 5 horas após a exposição à radiação UV em todos os grupos estudados. Sosa e colaboradores (2005) observaram pico máximo de inflamação em 6 horas, utilizando, porém o parâmetro edema como sinal inflamatório.

É notável que os animais do grupo 3 apresentaram menor eritema do que os animais dos demais grupos. A diferença no valor de (a) para os grupos foi considerada significativa pelo teste t ($p=0,0092$), sendo um indicativo de que as propriedades antiinflamatórias do óleo de lavanda merecem ser estudadas por métodos complementares, que investiguem outros sinais da inflamação como edema, aumento da temperatura local, infiltração e migração de células inflamatórias, etc.

Os animais do grupo 4, tratados com óleo essencial de lavanda puro apresentaram porém vermelhidão semelhante ao grupo controle (grupo 1) e intensa descamação e desidratação em 48 e 72 horas.

O óleo de lavanda é rico em monoterpenos conhecidamente utilizados como promotores de absorção, ou seja, substâncias capazes de aumentar a absorção de moléculas através do estrato córneo (AQIL, 2007). Os terpenos são considerados seguros pela Food and Drug Administration (FDA) e na maioria dos casos não causam toxicidade (OCABE, 1990, AQIL, 2007).

Segundo AQIL e colaboradores (2007) o cineol e o linalol entre outros terpenos atuam como promotores de absorção. Pelos estudos de determinação dos componentes presentes no óleo de lavanda por CG-MS pode-se observar a presença desses componentes nas quantidades de 3,69% e 37,40% respectivamente. No caso dos animais tratados com o óleo de lavanda, é possível que a quantidade desses terpenos tenha sido suficiente para provocar aumento da circulação local e conseqüente aumento da vermelhidão cutânea. O mecanismo proposto por Vaddi (2002) para o aumento da permeação cutânea através do uso dos terpenos cineol e linalol seria por interação com os lipídeos do estrato córneo. Assim, a constante aplicação do

óleo essencial de lavanda pode ter resultado na desorganização do estrato córneo, com conseqüente aumento da perda transepidermal de água ocasionando desidratação e descamação da pele. Segundo Marquele - Oliveira (2007), a descamação pode ser resultado de um possível efeito cicatrizante do óleo, que induz à maior proliferação de células epidérmicas para sanar a lesão.

Os resultados sugerem que além da investigação do efeito antiinflamatório pelo método proposto, estudos mais complexos devem ser realizados para elucidar o efeito do óleo essencial de lavanda sobre outros parâmetros da inflamação, a fim de esclarecer os possíveis mecanismos antiinflamatórios deste óleo, bem como avaliar a dosagem adequada para que não provoque irritação ou desidratação cutânea.

6 - CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados experimentais obtidos, é possível concluir:

- ✓ O valor de EHL requerido pelo óleo de maracujá é 10,0.
- ✓ A adição do óleo essencial de lavanda não provocou mudanças no valor de EHL requerido pelo sistema.
- ✓ É possível obter nanoemulsões estáveis contendo óleo de maracujá, óleo essencial de lavanda a partir dos tensoativos hidrofílicos *PEG-30 castor oil* ou *PEG-40 castor oil* associados ao lipofílico, monooleato de sorbitano.
- ✓ A adição do óleo essencial de lavanda no sistema constituído de óleo de maracujá, *PEG-30 castor oil*, monooleato de sorbitano e água favoreceu a diminuição do tamanho de glóbulos quando comparada à emulsões sem este óleo, contendo a mesma razão entre as fases oleosa/tensoativa/aquosa.
- ✓ Não foi possível determinar o PIT em emulsões constituídas de óleo de maracujá e a mistura dos tensoativos *PEG-30 castor oil* e monooleato de sorbitano, indicando que formação de nanoemulsão nesse sistema não está relacionada à temperatura;
- ✓ É possível obter a nanoemulsão F5 por ambos os métodos de baixa energia de emulsificação (PIT e EPI), porém em F1 e F2 o processo envolvido é o EPI.
- ✓ A velocidade de agitação é um parâmetro crítico na obtenção de nanoemulsões pelo método do EPI, sendo que a velocidade de 600 rpm foi a mais eficaz.
- ✓ A concentração de tensoativo mínima necessária para formação das nanoemulsões estudadas é de 5,0%.
- ✓ A adição de eletrólitos desestabilizou a emulsão F5 quando submetida a temperaturas elevadas.
- ✓ A adição dos silicones carbinol 5562[®] e 245 Fluid[®] provocou processos de instabilidade como cremeação ou separação de fases quando submetida aos testes de

estabilidade preliminares, sendo que as formulações contendo os tensoativos 190 Fluid[®] foram as mais estáveis.

- ✓ No teste antiinflamatório *in vivo* a emulsão contendo 5,0% do óleo de lavanda provocou redução significativa do eritema comparado ao apresentado pelos demais grupos (test t), sendo merecedor de estudos complementares para uma avaliação mais completa da sua provável atividade antiinflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995, p.469.

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation research**, Amsterdam, v.571, p.153-173, 2005.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, disponível em: www.anvisa.org.br, acesso em: 20 de abril, 2006.

AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. **Drug Discovery Today**, v.12, n.23/24, 2007.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The science of dosage form design**, New York: Churchill Livingstone, 1995, p. 290-292.

BALSAM, M. S. Fragrance. In: BALSAM, M.S., SAGARIN, E., **Cosmetics and Science Technology**, v.2, ed.2, New York: Jonhn Wiley & Sons, 1972, p. 599-634.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M. E. **Pharmaceutics the science of dosage form design**. London: Churchil Livingstone, 2002, p.499-533.

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

BECHER, P. **Emulsions: theory and practices**. New York: Reinhold, 1965,p.1.

BECHER, P., SCHICK, M. J. Macroemulsions In: SCHICK, M. J. **Nonionic Surfactants - Physical Chemistry**, v. 23, New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p.435-491.

BENITA, S., LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, n. 11, p. 1069-1070, 1993.

BERACA SABARÁ - Informe técnico. disponível em: <<http://www.beracasabara.com.br>>, acesso em: 15 de agosto, 2006.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries (Ed. Port.)**, São Paulo, v.15, n. 5, p.46-9, 2003.

BOELENS, M. H., ARQUETTE, J. D. Chemical and sensory evaluation of Lavandula oils, **Perfum Flav.** v. 20, p.23-51, 1995.

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, v. 280, p. 241-251, 2004.

BOUWSTRA, J. A. HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in lipid research*, Oxford, v. 42, p. 1-36, 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 IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12, 1995, São Paulo. **Anais.** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995, p. 6-19.

BROOKS, B. W.; RICHMOND, H. N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In: BINKS, B.P. **Modern Aspects of Emulsion Science**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 175-203, 1998.

BRUNETON, J. Pharmacognosie. **Phytochimie Plantes medicinales.** ed. 2. Paris: Tec Doc, p. 915, 1993.

CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions, **Advances in Colloid Interfacial Science**, Amsterdam, v.107, p. 125-55, 2004.

CARVALHO, J. C. T. Inflamação In: SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** 1ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.408 p.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo.** 2005. 229 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CAVANAGH, H. M.; WILKINSON, J. M. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy files**, v.16, p.301-308, 2002.

CHAN, S. Y.; PO, A. L. W. Quantitative assessment of non-steroidal anti-inflammatory topical products in nicotinate-induced erythema using tristimulus colour analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.83, p.73-86, 1992.

CHARDON, A.; CRETOIS, I.; HOURSEAU, C. Skin color typology and sustaining pathways, **International Journal of Cosmetic Science**, v.13, p. 191-208, 1991.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid Crystals and Cosmetic Applications. **Cosmetic & Toiletries**, v.105, n.5, p.57- 62, 1990.

COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J.; PARRA, J. L.; COLL, J.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 11, p.5-19, 1989.

DAVIS, H. M. Analysis of creams and lotions. In: SENZEL, A. J. **Newburger's manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, cap.4, 1997, p.32.

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

DEY, P. M.; HARBONE, J. B. **Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 529 p., 1997.

DOB, T.; DAHMANE, D.; TAYEB, B.; CHELGHOUM, C. Chemical composition of the essential oil of *Lavandula dentate L.* from Algeria. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.110-114, 2005.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions 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 Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1998.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. In: _____ **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, p.374, 382, 534.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nanoemulsions by low- energy emulsification methods at constant temperature, **Langmuir**, v.17, p. 2076-2083, 2001.

FRIBERG, S. E.; GOLDSMITH, L. B.; HILTON, M. L. Theory of Emulsions. In: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. New York: Marcel Dekker Inc. 1988. p. 49-91.

FRIBERG, S. E.; HILTON, M. L.; GOLDSMITH, L. B. Emulsions are not only two liquids; **Cosmetics and Toiletries**, New York, v. 102, n. 2, p. 87-96, 1987.

GABRIELI, C.; KOKKALOU, E. A new acetylated glucoside of lueolin and two flavone glucosides from *Lavandula stoechas*. **Pharmazie**, v.58, p. 426- 427, 2003.

GONÇALVES, R. A. **Desenvolvimento e avaliação *in vivo* e *in vitro* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**.2000, 169 f Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

GOPAL, E. S. R. In: SHERMAN, P. **Emulsion Science**. London: Academic Press, 1969.

GRIFFIN, W. C.; LYNCH, M. J.; LATHROP, L. B. Emulsions, parts one/two. **Drug Cosmet. Ind.**, v.10, p.41-45, 170-173, 1967.

GU, Y.; LI, D. The zeta potencial of silicone oil droplets dispersed in aqueous solutions, **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 206, p. 346-349, 1998.

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

GUTERRES, S. S.; PASA, A. A.; PIMENTA, M. A. **Raio-X da nanociência brasileira**. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC. 58. 2006. Florianópolis. p.9-13, 2006. Anais eletrônicos, disponível em: http://www.sbpnet.org.br/arquivos/arquivo_181, consultado em 10 de agosto de 2007.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**, 2 ed. New York: Jonh Wiley & Sons Ltd. 2002. p. 451-71.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.**, v.143, n.1, p. 35-38, 1988.

_____. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.** v. 142, n.2, p.38--43, 1993b.

_____. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.** v.142, n.1, p. 27-30, 1993a.

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

JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of 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. 247-256, 2001.

KANEI, N.; TAMURA, Y.; KUNIEDA, H. Effect of types of perfume compounds on the hydrophile – lipophile balance temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.218, p.13-22, 1999.

KLANG, S. H.; FRUCHT-PERY, J.; HOFFMAN, A.; BENITA, S. Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively charged submicron emulsion vehicle. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, v.46, p.986-993, 1994.

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.18, p.13-21, 2003.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, trad. : João F. Pinto e Ana Isabel Fernandez. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, p.509-1517, 2001.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **J. Food. Sci.**, v.55, n.6, p.1666-1668, 1990.

LEE, V. H. L. Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1527-1528, 2004.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. Disperse Systems In: _____, **Pharmaceutical Dosage Forms**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1988.

LIN, T. J.; KURIHARA, H.; OTHA, 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 nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, p.557-563, 2006.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’être” of epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Bartimore, v.121, p.231-241, 2003.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudo da estabilidade, permeação e**

retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

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

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

MARTIN, A. N.; MEDWICK, T.; KING, R. E. **Remington's pharmaceutical sciences.** ed. 18: Easton, Mack, 1990. p.298-309.

MARTINI, E.; **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química.** 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, p.298-308, 2004.

MEUNIER, C. As plantas da Lavândula e Lavandina. **Dragoco Report**, p. 146-158, 1989.

MIGUEL, M. S. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** São Paulo: Robe, p.98. 1999.

MILLER, D. J.; HENNING, T.; GRÜNBEIN, W. Phase inversion of W/ O emulsions by adding hydrophilic surfactant- a technique for making cosmetics products. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, Amsterdam, v.183-185, p.681-688, 2001.

MONDELLO, L.; ZAPPIA, G.; COTRONEO, A.; BONACCORSI, I.; CLOUDHURY, J. U.; YUSUF, M.; DUGO, G. Studies on the essential oil bearing plants of Bangladesh Part VII. Composition of some *Ocimum* oils, *O. basilicum* L. var. *purpurascens*; *O. sanctum* L. green; *O. sanctum* L. purple; *O. americanum* L.; citral type; *O. americanum* L. camphor type. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p.335-40, 2002.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).** 2006. 158f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H. ; DELICATO, T. ; AZZINI, R. ; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/ water nanoemulsions 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, 2006a.

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

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

MORITA, T.; ASSUNÇÃO, R. M. V. Reagentes gerais especiais. In: _____ **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1988. 627p.

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

O'LENICK, A. Silicone emulsions and surfactants. **J. Surfactants Deterg**, v.3, n.3, p. 387-93, 2000.

OKABE, H. percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. **Drug Des. Deliv.**, v.6, p.229-38, 1990.

ORAFIDIYA, L.O.; OLADIMEJI, F. A., Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241-249, 2002.

PAGLIARA, A., REIST, M., GEINOZ, S., CARRUPT, P. A., TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.51, p.1339-1357, 1999.

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 Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.**, v.288, p.144-150, 2006.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões, **Cosmetic & Toiletries (ed. Port.)**, v.10, n.6, p.44-56, 1998.

POLITI, M.; DE TOMMASI, N.; PESCIPELLI, G.; DI BARI, L.; MORELLI, I.; BRACA, A. Structure and absolute configuration of new terpenes from *Lavandula multifida*. **J. Nat. Prod.**, v.65, p.1742-45, 2002.

POLYMER HANDBOOK, ed.3. New York: Wiley, 1989.

PONTES, M. A. N. Estudos dos subprodutos do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.): III. Obtenção do óleo e da torta. **Boletim do CEPPA**, v.7, n.1, p.23- 321,1989.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. ed. 4, v.1, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992. p. 147-171, 959-1008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. ed. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981 .p. 179-210, 1125-128.

PROKSCH, E.; NISSEN, H. P.; BREMGARTNER, M.; URQUHART, C. Bathing in a magnesium-rich Dead Sea salt solution improves skin barrier function, enhances skin hydration, and reduces inflammation in atopic dry skin. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 44, p. 151-157, 2005.

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

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries (Ed. Port.)**, v.8, n.5, p.47- 53, 1996.

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

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Emulsions. **Cosmetics & Toiletries. (Ed. Port.)** v.113, n.9, p.39-44, 2000.

SAJJADI, S. Effect of mixing protocol on formation of fine emulsions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p.3009-017, 2006.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/ water emulsions with the non-ionic surfactant pair: sorbitano monolaurate/ polyoxyethylene sorbitano monolaurate (Span 20/ tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.252, p.27-32, 2003.

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

SALAGER, J. L.; MARQUÉX, L. ; PEÑA, A. A.; RONDÓN, M.; SILVA, F, F.; TYRODE, E. Current Phenomenological know-how and modeling of emulsion inversion, **Industry and Engineering Chemical Research**., Washington, D. C., v.39, p.2665-2676, 2000.

SANT'ANNA, E. S.; TÔRRES, R. C. O.; PORTO, A. C., Avaliação de diferentes métodos cromatográficos na determinação de ácidos graxos em sementes de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Boletim Ceppa**, Curitiba, v.19, n.1, p.84-94, 2001.

SANTOS, O. H. D. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristais líquidos**. 2006. 147f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SHINODA, K.; SAITO, H. The effect of Temperature on the Phase Quilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane and nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.26, p. 70-74, 1968.

SILVA, A. R. **Tudo sobre aromaterapia: como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira**. São Paulo: Roca, 624p.1998.

SILVA, E. C., SOARES, I. C. Tecnologia de Emulsões. **Cosmetics & Toiletries (ed. Port.)**, São Paulo, v.8, n.5, p.37-46, 1996.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia : Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 387-415.

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

SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Nano- emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.288, p.138-143, 2006.

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

SOROKINA, T. V.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S. Evaporation of the fragrance component, cinnamyl alcohol, using simultaneous TG-DTA. **Thermochimia Acta**, v.392-393, p.315-321, 2002.

SOSA, S.; ALTINIER, G.; POLITI, M.; BRACA, A.; MORELLI, I.; LOGGIA, R. D. Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. **Phytomedicine**, v.12, p.271-277, 2005.

STACHURSKI, J. S.; MICHALEK, M. The effect of the zeta potential on the stability of a non- polar oil-water emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.184, p.433-436, 1996.

TADROS, T. F.; BECKER, P. In: _____. **Encyclopedia of Emulsion Technology**, New York: Marcel Dekker, v.1, 1983. p. 129-285.

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

ÚSON, N.; GARCIA, M. J.; SOLANS, C. Formation of water-in-oil (W/O) nano- emulsions in a water / mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low- energy emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.250, p.415-421, 2004.

VADDI, H. K. Terpenes in propylene glycols as skin-penetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1639-51, 2002.

WITTERN, K. P. ; ANSMANN, A. ; HUTTINGER, R. ; BILLEK, D. ; CHARLET, E. ; HOENEN, L. ; KUCZERA, K. ; MOTITSCHKE, L. ; QUACK, J. ; SEIB, K. ; UMBACH, I. ; WOLFF, G. Stability testing of cosmetic emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v.100, n.10, p.33-39, 1985.

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.

ZATZ, J. Rational and approaches to skin permeation. In: _____. **Skin Permeation-Fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p.11-31, 1993.

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.

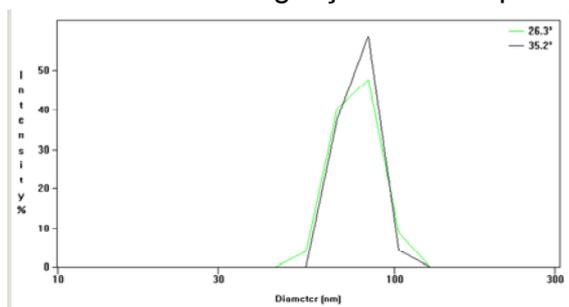
ZETA-METER INC. Potencial Zeta: Um curso completo em 5 minutos. Staunton, VA, USA, **Catálogo**.

APÊNDICES

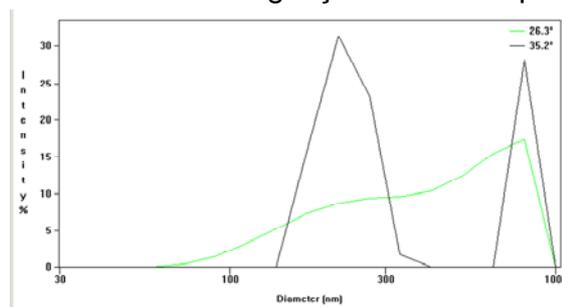
APÊNDICES

APÊNDICE A - Distribuição granulométrica da formulações F1 e F2 após serem submetidas às velocidades de agitação de 600, 8.000 e 9.500 rpm.

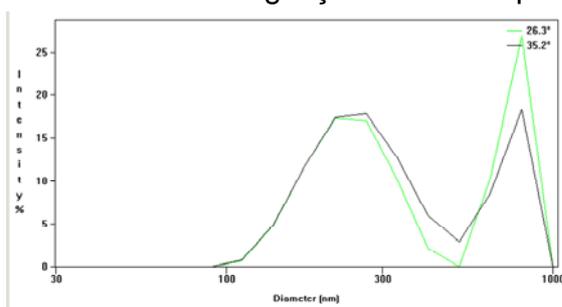
F1- submetida à agitação de 600 rpm



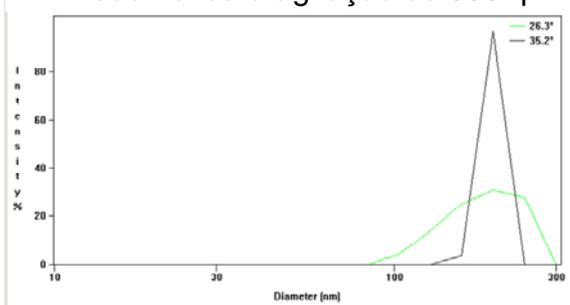
F1- submetida à agitação de 8.000 rpm



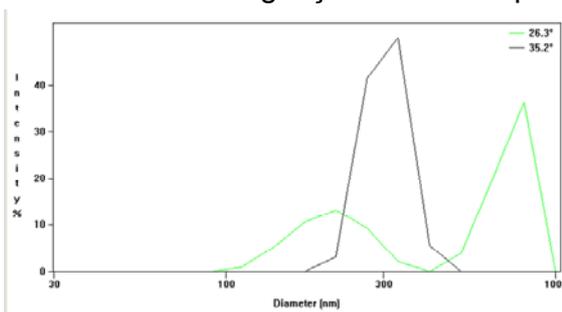
F1- submetida à agitação de 9.500 rpm



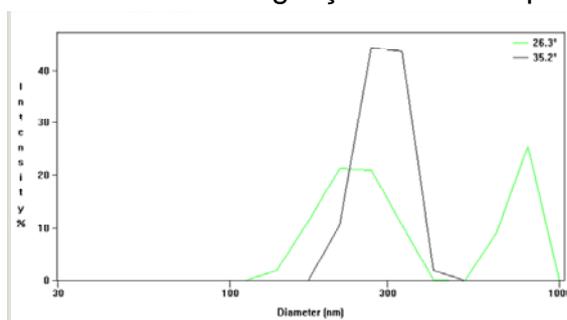
F2 submetida à agitação de 600 rpm



F2 submetida à agitação de 8.000 rpm

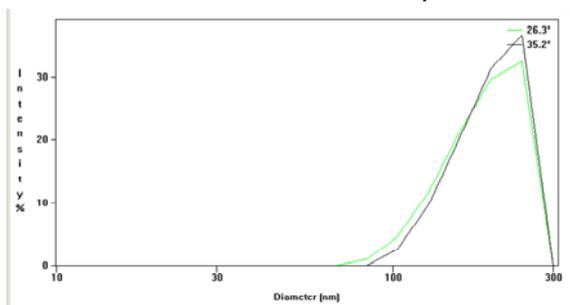


F2 submetida à agitação de 9.500 rpm

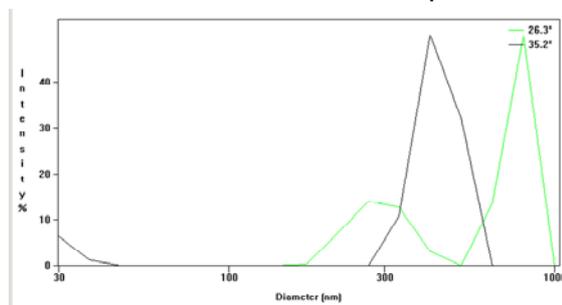


APÊNDICE B - Distribuição granulométrica da formulação F5 após ser submetida às velocidades de agitação de 600, 8.000 e 9.500 rpm.

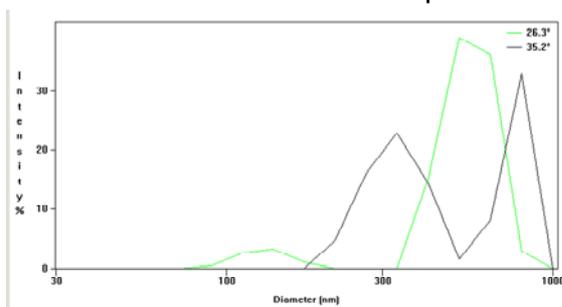
F5 submetida à 600 rpm



F5 submetida à 8.000 rpm



F5 submetida à 9.500 rpm



ANEXO

ANEXO

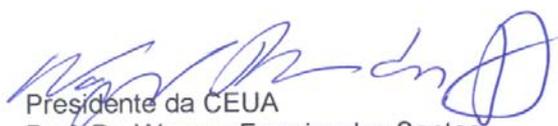


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.994.53.5), intitulado: "Desenvolvimento de Nano Emulsões à Base de Óleo de Maracujá e Óleo Essencial de Lavanda e Avaliação da Atividade Antiinflamatória Tópica", de autoria de **Maria Fernanda Pires de Camargo** e de **Pedro Alves Rocha Filho**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 14.02.2008.

Ribeirão Preto, 15 de fevereiro de 2008



Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos



Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro