

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA DE OURO PRETO

HYGOR MEZADRI

Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos

OURO PRETO
2010

HYGOR MEZADRI

Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho

OURO PRETO
2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wanderly Mezdri e Iziná Luzia Fioroti, que sempre me apoiaram incondicionalmente em minhas decisões, o que fez com que eu adquirisse autonomia e discernimento em todos os aspectos da minha vida, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio e confiança depositados em mim, não me deixando esquecer meus objetivos.

Ao meu orientador Professor Dr. Orlando David Henrique dos Santos, que possibilitou o ingresso no mundo da pesquisa, obrigado pela oportunidade, conhecimento e paciência, que tornaram possível esta realização.

Ao co-orientador Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) pelas boas idéias, pelo conhecimento compartilhado e pelos diálogos e cafezinhos sempre construtivos.

À Dra. Lucienir Pains Duarte do Núcleo de Estudos de Plantas Mediciniais (NEPLAM) do Departamento de Química – ICEX – UFMG, pela colaboração no trabalho desenvolvido.

Ao Eduardo, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica, da Faculdade de Farmácia – UFMG, pela atenção.

Aos colegas de mestrado por compartilharem todos os momentos vividos no mestrado, os ótimos, os bons e é claro os momentos difíceis, pois sem eles nada valeria a pena. Em especial à Carolina e a Paty.

Ao ensino público, gratuito e de qualidade, em especial à querida Escola de Farmácia de Ouro Preto, lugar onde aprendi muitas lições.

Ao “Listerine” pelas conversas, reclamações e tudo mais que um mestrado precisa pra ser completo.

À REPÚBLICA MARACANGALHA, pelos melhores dias da minha vida, ficam a saudade e a certeza de que sempre retornarei, valeu!

A todos que acreditam em mim, muito obrigado.

“Cuidado para não chamar de inteligentes apenas
àqueles que pensam como você.”
(Ugo Ojetti)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 – INTRODUÇÃO	2
2 – REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 – Pele	5
2.2 – Emulsões	7
2.3 – Nanoemulsões	8
2.4 – Métodos de obtenção	9
2.5 – Esqualeno e esqualano	11
2.6 – Radicais livres	12
2.7 – <i>Syagrus romanzoffiana</i>	13
3 – OBJETIVOS	17
3.1 – Objetivos específicos	17
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 – Materiais	19
4.1.1 – Fase oleosa	19
4.1.2 – Fase aquosa	19

4.1.3 – Tensoativos	19
4.1.4 – <i>Syagrus romanzoffiana</i>	19
4.1.6 – Ácido retinóico	19
4.1.5 – DPPH	20
4.1.7 – Ácido retinóico creme comercial	20
4.2 – Métodos	20
4.2.1 – <i>Syagrus romanzoffiana</i>	20
4.2.2 – Obtenção dos extratos da casca e polpa	21
4.2.3 – Análise fitoquímico dos extratos de <i>Syagrus romanzoffiana</i>	22
4.2.3.1 – Cromatografia em camada delgada (CCD)	22
4.2.3.2 – Cromatografia em coluna clássica do extrato hexânico	23
4.2.3.3 – Espectroscopia na região do infravermelho	24
4.2.3.3 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	24
4.2.3.4 – Cromatografia gasosa (CG-FID)	24
4.2.4 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Syagrus romanzoffiana in vitro</i>	25
4.2.5 – Preparo das emulsões pelo método de EPI utilizando aquecimento	25
4.2.6 – Determinação do EHL requerido para o óleo Esqualano	26
4.2.7 – Preparo das nanoemulsões	27
4.2.8 – Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos	27
4.2.9 – Determinação da temperatura de inversão de fases	27
4.2.10 – Determinação do valor de pH	28

4.2.11 – Caracterização da distribuição granulométrica e do potencial zeta	28
4.2.12 – Avaliação da estabilidade preliminar	28
4.2.12.1 – Avaliação macroscópica	28
4.2.12.2 – Avaliação microscópica	29
4.2.12.3 – Centrifugação	29
4.2.12.4 – Estresse térmico	29
4.2.13 – Determinação do comportamento reológico das formulações	29
4.2.14 – Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração de Ácido Retinóico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	30
4.2.15 – Teste de liberação <i>in vitro</i>	31
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 – Análise fitoquímica dos extratos dos frutos de <i>Syagrus romanzoffiana</i>	33
5.2 – Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos extratos de <i>Syagrus romanzoffiana</i>	48
5.3 – Determinação do EHL requerido para o óleo esqualano	50
5.4 – Obtenção das nanoemulsões	50
5.5 – Determinação da temperatura de inversão de fases	51
5.6 – Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos	52
5.7 – Determinação dos valores de pH	53
5.8 – Determinação da granulometria e dos valores de potencial zeta	54
5.9 – Avaliação da estabilidade preliminar	56
5.10 – Comportamento reológico das formulações	58

5.11 – Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	59
5.12 – Estudo de liberação <i>in vitro</i> do ácido retinóico	60
6 – CONCLUSÕES	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8 - ANEXOS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação botânica da planta de <i>Syagrus romanzoffiana</i> .	15
Tabela 2: Fase móvel utilizada para cada grupo de frações e peso dos grupos após a cromatografia em coluna clássica.	23
Tabela 3: Concentração de tensoativos requeridos na determinação do EHL requerido para o óleo esqualano.	26
Tabela 4: Ácidos graxos de cadeia longa detectados no extrato hexânico de <i>Syagrus romanzoffiana</i> (SREH), por cromatografia gasosa.	34
Tabela 5: Atribuições de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para Hg6b2.	45
Tabela 6: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de SRPEE-1 com dados da literatura.	47
Tabela 7: Constituição das formulações que apresentaram características macro e microscópicas satisfatórias.	51
Tabela 8: Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico.	54
Tabela 9: Determinação dos valores de pH das formulações antes e após o estresse térmico.	55
Tabela 10: Granulometria e potencial zeta das nanoemulsões.	57
Tabela 11: Comportamento reológico das formulações.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pele e anexos cutâneos.	5
Figura 2: Representação dos glóbulos de emulsões do tipo A/O e O/A.	6
Figura 3: Estrutura química do esqualano.	11
Figura 4: Estrutura química do esqualeno.	11
Figura 5: Foto da palmeira <i>Syagru romanzoffiana</i> .	14
Figura 6: Estrutura química do ácido retinóico.	20
Figura 7: Esquema do processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico de <i>S. romanzoffiana</i> .	21
Figura 8: Esquema da célula do tipo Franz modificada utilizada no teste de liberação.	31
Figura 9: Cromatograma extrato hexânico da polpa dos frutos de <i>Syagrus romanzoffiana</i> (SREH) obtido por CG coluna SE-54, em condição isotérmica a 280 ⁰ C, com temperatura do detector a 280 ⁰ C e do injetor a 270 ⁰ C.	33
Figura 10: Espectro do extrato hexânico da polpa dos frutos de <i>Syagrus romanzoffiana</i> (SREH) obtido por espectrometria na região do infravermelho.	35
Figura 11: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da fração Hg1, obtida por cromatografia em coluna de SREH.	36
Figura 12: Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) da fração Hg1, obtida por cromatografia em coluna de SREH.	37

- Figura 13:** Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg1, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 38
- Figura 14:** Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 39
- Figura 15:** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 39
- Figura 16:** Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 40
- Figura 17:** Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 41
- Figura 18:** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 42
- Figura 19:** Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH. 43
- Figura 20:** Estrutura química proposta para Hg6b, com as atribuições de RMN de ^1H e de ^{13}C . 44
- Figura 21:** Estrutura química da sacarose (α -D-glicopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo). 48
- Figura 22:** Regressão linear da atividade antioxidante do extrato hexânico da casca e polpa de *S. romanzoffiana* após 30 minutos. 49
- Figura 23:** Regressão linear da atividade antioxidante do extrato etanólico de *S. romanzoffiana* após 30 minutos. 49

- Figura 24:** Valores da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) pela temperatura ($^{\circ}\text{C}$) das formulações F1, F2, F3 e F4, em função da temperatura. 51
- Figura 25:** Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos. 53
- Figura 26:** Curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação do ácido retinóico (AR) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 59
- Figura 27:** Cromatograma obtido por CLAE a partir da injeção do ácido retinóico grau farmacêutico. 60
- Figura 28:** Perfil de liberação de ácido retinóico em células do tipo Franz, utilizando membranas de nylon. 61

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Ácido retinóico
A/O	Água em óleo
CCC	Cromatografia em coluna clássica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EPI	Emulsificação por inversão de fases
O/A	Óleo em água
PIT	Inversão de fases pela temperatura
PTEA	Perda trans-epitelial de água
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta

RESUMO

RESUMO

MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* e estudo fitoquímico destes extratos.** 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

Os produtos cosméticos que contém substâncias ativas de origem vegetal apresentam grande aceitação do público consumidor, aliado a nanotecnologia que apresenta diversas vantagens em relação às formulações convencionais como maior estabilidade, aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, podendo ainda facilitar a penetração de ativos na pele, sendo assim estes produtos se tornam um importante campo de estudo de novos produtos. O estudo de extratos vegetais para aplicação em fitocosméticos tem como um dos alvos a capacidade antioxidante destes compostos vegetais, sendo utilizados na prevenção do envelhecimento da pele pela ação de radicais livres, sendo assim esta pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*, bem como a caracterização fitoquímicas e avaliação da atividade antioxidante destes extratos. Utilizou-se tensoativos não iônicos pelo método de inversão de fases para a obtenção de nanoemulsões a partir do óleo de esqualano a 10% contendo estes extratos. No presente estudo além da capacidade antioxidante destes extratos pelo método de seqüestro de radicais livres por DPPH, as formulações foram avaliadas aspectos físico-químicos, comportamento reológico, granulometria, além da capacidade de aumentar a liberação de ativos através de experimentos *in vitro*, utilizando o modelo de células de Franz, para essa avaliação utilizou-se o ácido retinóico nanoemulsionado e um produto comercial. Os resultados demonstraram que as concentrações dos extratos, tanto hexânico com o etanólico, suficientes para apresentar atividade são facilmente incorporadas as nanoemulsões, sendo que estas apresentam excelentes características quanto a sua estabilidade. A análise fitoquímica possibilitou a caracterização do 1,3 – dipalmitoilglicerol e a identificação de onze ácidos graxos de cadeia longa no extrato hexânico, além da caracterização da sacarose no extrato etanólico. Além disso, o estudo de liberação do ácido retinóico demonstrou que as nanoemulsões formuladas apresentaram liberaram mais rápida quando comparado com a emulsão comercial, o que sugere uma boa liberação tópica de produtos transportados por este veículo.

Palavras-chave: ácido retinóico, antioxidante, célula de Franz, esqualano, fitocosméticos, nanoemulsão, *S. romanzoffiana*, 1,3 – dipalmitoil – glicerol.

ABSTRACT

ABSTRACT

MEZADRI, H. **Development of nanoemulsion containing extracts of the fruits of *Syagrus romanzoffiana* and phytochemical study of these extracts.** 2010. 94 f. Dissertation (Master of Science) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

Cosmetic products containing active substances of plant origin have great acceptance from consumers, combined with nanotechnology that presents several advantages over conventional formulations such as greater stability, pleasant sensory aspect, high spreadability and hydration, and may also facilitate the penetration of active in the skin. So these formulations become an important research field for development of new products. The study of plant extracts for application in phytocosmetic has as a target the antioxidant capacity of these plant compounds, being used for the prevention of skin aging by the action of free radicals, so this research was aimed to the development and characterization of nanoemulsion containing extracts of the fruits of *Syagrus romanzoffiana* as well as the phytochemical characterization and evaluation of the antioxidant properties of these extracts. We used phase inversion method and non-ionic surfactants for obtaining nanoemulsions of squalane oil containing these extracts. In this study, the antioxidant capacity of these extracts were measured by the method of sequestration of free radicals by DPPH, and the formulations were also evaluated in their physico-chemical aspects, rheological behavior, droplet size, and the ability to increase the release of actives by in vitro experiments, using Franz Diffusion Cell model. For this evaluation we used retinoic acid nanoemulsion and a commercial product. Results showed that the concentrations of the extracts, both hexanic and ethanolic, sufficient to produce antioxidant activity are easily incorporated in the nanoemulsions, and they have presented excellent characteristics as their stability. The phytochemical analysis allowed the characterization of 1,3 – dipalmitoyl – glycerol and identification of eleven long-chain fatty acids in the hexane extract, besides the characterization of sucrose in the ethanolic extract. Furthermore, the release study showed that nanoemulsions made the release of retinoic acid more rapidly when compared with the commercial emulsion, which suggests a good topical delivery system of drugs and active incorporated in this vehicle.

Keywords: retinoic acid, antioxidant, Franz cell, squalane, phytocosmetic, nanoemulsion, *S. romanzoffiana*, 1,3–dipalmitoyl – glycerol.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos as mulheres sentem a necessidade de ornamentar-se com maquiagens e outros adereços. Nas últimas décadas a preocupação voltou-se não apenas para esse tipo de vaidade, mas também para a questão de retardar o envelhecimento da pele, possibilitando uma aparência jovial por mais tempo. Esta não tem sido uma preocupação apenas do público feminino, também o masculino tem demonstrado interesse em diminuir os efeitos do envelhecimento.

Nos últimos anos a indústria de cosméticos tem sido desafiada a desenvolver fórmulas que atendam aos anseios de um público consumidor crescente cada vez mais exigente e que anseia por resultados mais rápidos, principalmente no que se refere aos produtos anti-envelhecimento.

Segundo Euromonitor de 2009 o Brasil ocupa o terceiro lugar em consumo de produtos cosméticos, representando 8,1% do mercado mundial, o que tem despertado ainda mais interesse pelo desenvolvimento de novos produtos por parte das indústrias desse setor.

Produtos emulsionados são empregados na indústria cosmética e farmacêutica em função das vantagens que estes apresentam como a veiculação de princípios ativos de diferentes afinidades na mesma formulação e sua facilidade de aplicação em produtos de uso tópico.

Com as descobertas relacionadas aos mecanismos que envolvem os sistemas emulsionados e a pele, este tipo de formulação tornou-se ainda mais interessante para sua aplicação como veículo.

Com isso desenvolvimento de produtos diferenciados que utilizam estes princípios tem sido alvo de vários estudos, com o propósito de melhorar suas características de acordo com a necessidade e aplicação dos mesmos.

Estes sistemas emulsionados diferenciados incluem as nanoemulsões, as emulsões múltiplas, as microemulsões e as emulsões com cristal líquido, cada uma apresentando características e vantagens diferenciadas.

As nanoemulsões apresentam várias características que as tornam de grande interesse cosmético, como sua estabilidade, pois são sistemas metaestáveis. Possuem ainda um alto poder de hidratação sobre a pele, além de possuírem uma característica muito importante para o uso em produtos cosméticos: seu aspecto sensorial é extremamente agradável (TADROS et al., 2004).

Para a obtenção de nanoemulsões existem métodos que envolvem alta ou baixa

energia de emulsificação. Os métodos que utilizam alta energia de emulsificação permitem um maior controle da granulometria das partículas, pois empregam uma alta tensão de cisalhamento.

Os métodos que envolvem baixa energia de emulsificação utilizam o conhecimento das propriedades físico-químicas do sistema para obter glóbulos de tamanhos reduzidos, sendo que estes apresentam um menor custo (ALMEIDA, 2008).

Extratos vegetais são incorporados em diferentes preparações cosméticas e, dependendo da classe química de seus ativos, podem ser responsáveis pela atividade do produto (ISAAC, 2008).

Podem ou não alterar a forma cosmética e o comportamento reológico da preparação conforme estudos realizados por Archondo (2003).

O Brasil, devido a sua extensão continental, possui uma diversidade de climas e ecossistemas que se refletem no número de espécies vegetais encontradas. Muitas delas são consideradas como oleaginosas, ou seja, produzem grande quantidade de material oleoso. Várias espécies são atualmente estudadas e utilizadas para a obtenção de óleos com aplicações diversas como produção de biodiesel, nutrição humana e/ou animal, produtos farmacêuticos e cosméticos, lubrificantes e outras aplicações.

Estes óleos são constituídos basicamente de triglicérides de ácidos graxos, podendo ter também alcoóis e ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas dissolvidas.

Dependendo da fonte vegetal, a composição de ácidos graxos varia muito no que tange o tamanho da cadeia, número de insaturações, ramificação da cadeia, entre outros. Esta variação traz uma complicação na obtenção de produtos emulsionados, pois o que se aplica a um óleo nem sempre pode ser convertido para outros.

As palmeiras do gênero *Syagrus* são espécies brasileiras, abundantes em nosso país, utilizadas popularmente no tratamento de algumas doenças. Os frutos destas palmeiras são de grande importância não apenas por apresentarem um alto valor nutricional e farmacológico, como também pela possibilidade de se tornar fonte de renda para famílias que vivem do extrativismo vegetal e pequenos produtores, sendo que estudos mais aprofundados são de grande valia para agregar valor a estes recursos naturais.

A indústria cosmética tem um papel importante neste contexto, uma vez que os produtos de origem vegetal têm grande aceitação e valorização no mercado mundial, tendo diversas aplicações.

REVISÃO DA LITERATURA

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Pele

Para compreender os mecanismos envolvidos na função das nanoemulsões sobre a pele é importante saber como funciona a estrutura e quais são as funções deste órgão tão necessário para a manutenção da vida humana.

A pele é o maior órgão do corpo humano, responsável pela separação do meio interno e do ambiente externo, prevenindo a entrada de microorganismos, substâncias químicas e várias formas de radiação. Possui ainda a capacidade de receber estímulo sensorial, regular a temperatura corporal e excretar substâncias indesejáveis (BARRY, 2002).

É um órgão constituído de camadas altamente organizadas e heterogêneas que inclui diversos anexos como folículo e glândulas. Como podemos observar na Figura 1, este órgão é composto por três camadas distintas, de fora para dentro, epiderme (estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme (BUCK, 2004).

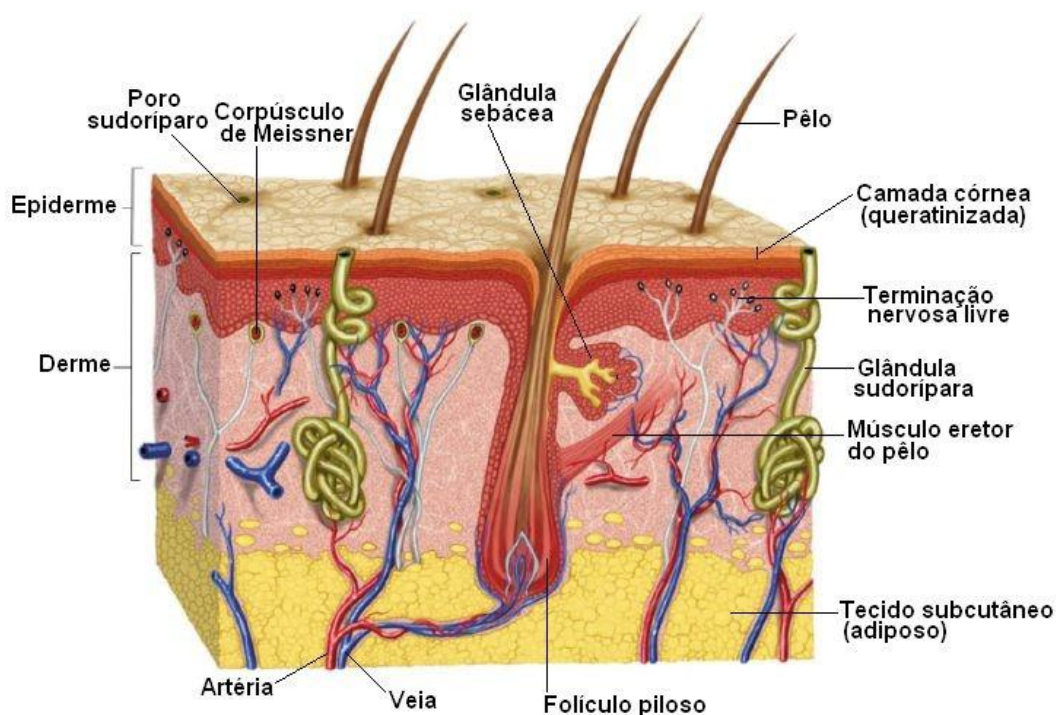


Figura 1 – Pele e anexos cutâneos. Reproduzida de: < <http://www.afh.bio.br> >

O estrato córneo, primeira barreira a ser transposta em um sistema de liberação dérmico é formado por uma camada de células alongadas, mortas e desidratadas, os

orneócitos, que são altamente queratinizadas, conferindo resistência a essas células.

A função de barreira do estrato córneo depende do acúmulo de uma mistura de lipídios em seu espaço intercelular. Como as células se movem da camada basal para a superfície da pele elas apresentam grande diferenciação, onde um aspecto importante é o acúmulo de lipídios. Grande parte desses lipídios é sintetizada pelos queratinócitos, que são envolvidos pelos grânulos lamelares. Além de lipídios, os grânulos lamelares oferecem uma série de enzimas hidrolíticas para o domínio intercelular, esta organela tem a forma redonda a ovóide e possui diâmetro de cerca de 200 nm (WERTZ, 2000).

Um termo muito utilizado para descrever o estrato córneo é o de “parede de tijolos”, onde as células queratinizadas estão imersas em uma matriz lipídica, disposta em bicamadas compostas por ceramidas (45-50%), colesterol (25%), ácidos graxos (10-15%) e lipídios (5%) (MADISON, 2003; WERTZ, 2000).

Abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, que é composta por células vivas metabolicamente ativas em diferentes estágios de diferenciação que são denominadas como camada granulosa, espinhosa e basal. Há ainda nas regiões mais espessas da pele como a palmar e plantar, onde não tem ocorrência de folículo piloso, outra camada denominada lúcida, que se localiza entre a camada granulosa e o estrato córneo.

O processo de renovação epidérmica ocorre da camada basal até o estrato córneo, onde há o desprendimento destas células já mortas, variando de acordo com a idade do indivíduo (EDWARDS; MARKS, 1995).

A derme é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas, que se localiza abaixo da epiderme. As principais células da derme são os fibroblastos, que produzem as fibras e a substância gelatinosa, onde estão imersos os elementos dérmicos. A camada subcutânea ou hipoderme, é responsável pelo isolamento térmico, reserva de energia e proteção contra choques mecânicos, tendo em vista que é um tecido conjuntivo frouxo constituído de fibras e células de armazenamento de gordura, denominados adipócitos (ZATS, 1993; BARRY, 2002; SMITH; MALBACH; SURBER, 2000).

A eficácia dos produtos de aplicação tópica sejam eles farmacêuticos ou cosméticos é dependente da penetração limitada destes na pele. Um método para promover aumento deste processo é a utilização de sistemas veiculados de liberação, como microemulsões, lipossomas e nanoemulsões (BARRY, 2002).

A hidratação da pele está relacionada com a integridade do estrato córneo (PROKSCH et al., 2005). Isto se deve ao fato de que o estrato córneo é a principal barreira contra a PTEA

(Perda Trans-Epidérmica de Água). Sabe-se atualmente que a hidratação da pele é alcançada através da diminuição da PTEA, o que faz com que a água seja retida nas camadas inferiores da epiderme, acumulando-se e hidratando o tecido (LODÉN, 2003).

A hidratação pode ser por oclusão onde uma espécie de película é formada sobre a superfície da pele impedindo ou diminuindo a perda trans-epidérmica de água, por umectação usando substâncias higroscópicas que retêm a água sobre a pele ou ainda por interação onde são utilizadas substâncias lipídicas que interagem com lipídeos da camada córnea mantendo a coesão entre as células.

2.2 – Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, consistindo de pelo menos um líquido imiscível disperso em outro na forma de glóbulos. As emulsões são constituídas por três fases: fase oleosa, fase aquosa e tensoativos (BECHER, SCHICK, 1987).

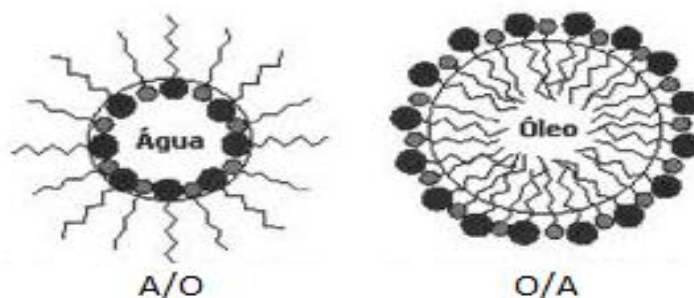


Figura 2 – Representação dos glóbulos de emulsões do tipo A/O e O/A.

Emulsões simples podem ser do tipo óleo em água (O/A) quando a fase interna ou descontínua é a oleosa, e emulsões do tipo água em óleo (A/O) quando a fase oleosa é a fase externa ou contínua. Na verdade, emulsões são, em princípio, duas fases imiscíveis para as quais a tensão interfacial é diferente de zero, mas estabilizada por agentes tensoativos, cada fase podendo conter numerosos componentes (PAYS, 2002).

A estabilidade de uma emulsão é muito importante para vários processos industriais e produtos emulsionados, mas a avaliação de sua estabilidade não é simples. Os processos envolvidos na quebra das emulsões têm sido extensivamente estudados por muitos pesquisadores e diferentes métodos para determinar a estabilidade da emulsão têm sido propostos, tais como análises de tamanho de gotas, medição de propriedades físicas de

emulsão, testes acelerados e espalhamento de luz. Entre estes métodos, os mais comuns são a análise de tamanho de gota e microscopia (KIM, 2000).

Os principais processos envolvidos com a estabilidade das nanoemulsões são: cremeação, floculação e coalescência.

A estabilização de dispersões coloidais pode ser dividida em dois mecanismos principais, a estabilização estérica e a eletrostática. A estabilização eletrostática ocorre devido às forças de repulsão entre as partículas que promovem uma maior estabilidade frente às forças de atração, tendo em vista que por apresentarem mesma constituição elas apresentam cargas superficiais semelhantes. A estabilização estérica se torna importante quando apresentam macromoléculas na superfície (CAPEK, 2002).

Os tensoativos são moléculas com características anfífilas que se localizam na interface entre a fase dispersa e a fase dispersante durante o processo de emulsificação estabilizando o processo (BROOKS, 1998).

A regra de Bancroft dá um primeiro guia empírico para formular emulsões: quando o surfactante é essencialmente solúvel em uma fase, essa fase tende a ser a fase contínua, sendo o outro a fase dispersa. Como consequência, uma emulsão O/A será preferencialmente obtida com um tensoativo solúvel em água enquanto que uma emulsão A/O será mais facilmente formada com um tensoativo mais solúvel em óleo. Num saldo hidrofílico-lipofílico de cada molécula de surfactante, deduzimos sua solubilidade preferencial com óleo ou água, valores de EHL próximos de zero (muito solúvel em óleo) e 40 (muito solúvel em água) foram atribuídos (PAYS, 2002).

Emulsões estáveis, especialmente as que utilizam tensoativos sintético são melhor formuladas quando utilizam um emulsionante ou combinação destes com valores próximos ao de EHL requerido pela fase oleosa (ORAFIDIYA, 2002). Esta é uma fase determinante do processo de formulação de uma emulsão estável.

2.3 – Nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas constituídos de glóbulos de tamanho reduzido, variando de 20 a 500 nm (FORGIARINI et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2004), transparentes ou translúcidos quando apresentam granulometria menor que 200 nm e de aparência leitosa acima de 200 nm, diferentemente das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são cineticamente estáveis, ou seja estáveis por um longo período de tempo. (TADROS, 2004; CAPEK, 2004).

A alta estabilidade coloidal das nanoemulsões é mais bem entendida a partir de sua estabilização estérica ao utilizar polímeros não iônicos, reduzindo os efeitos de coalescência sobre o sistema. Além disso, o movimento browniano presente nessas formulações superam os efeitos da força da gravidade atuantes nesses glóbulos (TADROS, 2004).

O tamanho reduzido dos glóbulos dificulta a deformação destes, diminuindo ainda mais a instabilidade por coalescência. A espessura do filme interfacial dessas partículas, em relação ao tamanho dos glóbulos, dificulta o rompimento destes glóbulos por redução natural deste filme (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS, 2004; MORAIS et al., 2006).

O grande interesse em nanoemulsões para produtos cosméticos é explicado devido às várias vantagens que estas formulações apresentam, tais como:

I – O tamanho reduzido dos glóbulos faz com que o movimento browniano seja capaz de superar a força da gravidade, diminuindo fenômenos de instabilidade como cremeação e sedimentação.

II – O tamanho dos glóbulos também diminui efeitos de floculação, fazendo com que o meio permaneça disperso sem separação.

III – O tamanho reduzido previne efeitos de coalescência, desde que não haja deformação da superfície, além disso, a espessura do filme de tensoativo em relação ao tamanho das partículas faz com que não ocorra ruptura do filme líquido entre as gotas.

IV – Nanoemulsões são sistemas adequados para a distribuição eficientes de ingredientes ativos pela pele. A grande área superficial de sistemas emulsionados permite maior superfície de contato, podendo facilitar a penetração de ativos.

V – Devido ao seu tamanho reduzido são capazes de penetrar nas rugosidades da pele áspera, aumentando a penetração de ativos.

VI – O sistema de natureza transparente, sua fluidez (em concentrações razoáveis de fase oleosa) e a ausência de espessantes conferem uma característica agradável de caráter estético e boa sensação sobre a pele.

VII – Requer uma menor concentração de tensoativos quando comparado às microemulsões.

VIII – Depósito uniforme em substratos devido ao tamanho das partículas. Umectação, difusão e penetração também são reforçadas devido à baixa tensão superficial do sistema e baixa tensão interfacial entre as gotículas.

IX – Podem ser utilizadas na distribuição de fragrâncias, em produtos de uso pessoal, o que é de interesse na formulação de perfumes livres de álcool.

X – Aplicação como substitutos de lipossomas e vesículas, que são menos estáveis, e é

possível em alguns casos construir uma fase lamelar líquido-cristalina em volta das gotículas.

Nanoemulsões são sistemas muito frágeis por natureza. Como eles são transparentes e muito fluidos o mínimo de instabilidade que apresentar é facilmente notado (SONNEVILLE-AUBRUN, 2004).

2.4 – Métodos de obtenção

Atualmente existem vários métodos para fabricação de nanoemulsões, alguns que utilizam alta energia como homogeneização a alta pressão e microfluidização, e outros que envolvem baixa energia, como a emulsificação espontânea (ALMEIDA, 2008).

Os métodos que envolvem alta energia de emulsificação utilizam aparelhos que geram alta energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou utilização de fluidizadores (FERNANDEZ et al. 2004; TADROS et al., 2004; LIU et al., 2006) . A alta energia imposta neste processo é capaz de deformar e quebrar as partículas da fase interna, formando glóbulos menores (FERNANDEZ et al., 2004).

As técnicas envolvendo alta energia permitem um maior controle da granulometria do sistema, além de ampliar as possibilidades de escolha dos constituintes das formulações (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). Entretanto estas técnicas demandam altos investimentos na compra dos aparelhos utilizados, sendo este um fator limitante para a utilização destas técnicas.

Para o preparo de nanoemulsões é necessário uma fase oleosa, uma fase aquosa, tensoativos. Sendo que as propriedades físico-químicas destes componentes afetam diretamente o comportamento das emulsões. Um dos fatores importantes para determinar a natureza da emulsão, A/O ou O/A, é a afinidade dos tensoativos pelas fases, aquosa e oleosa. (BROOKS, 2003; TADROS, 2004).

Existem dois métodos de emulsificação que utilizam baixa energia, inversão de fases pela temperatura, e inversão de fases por alteração das frações volumétricas. Estes métodos utilizam aparelhos de menor custo, quando comparado aos métodos de alta energia.

A preparação de nanoemulsões estabilizadas por surfactantes não iônicos tem sido amplamente estudada tanto pelo método de alta energia quanto pelo método de baixa energia.

Em métodos para preparação de nanoemulsões tipo O/A envolvendo métodos de baixa energia de emulsificação, a alteração da curvatura do tensoativo necessária para obter nanoemulsões é conseguida mudando o grau de hidratação das cadeias polioxietileno, em

tensoativos não iônico polioxi etilenado, alterando a temperatura (método PIT) ou o teor de água (método EIP). Inversão para nanoemulsões (A / O) também foi obtida através do método EIP (USÓN; GARCIA; SOLANS, 2004).

Para tensoativos polietoxilados, quando se aumenta a temperatura do sistema ocorre desidratação dos grupos etoxila, que são responsáveis pelo caráter hidrofílico do tensoativo, fazendo com que em temperaturas mais altas seja favorecida a formação de emulsões A/O e em temperaturas mais baixas a formação de emulsões O/A. Durante o resfriamento do sistema o tensoativo passa por um ponto de curvatura zero, tendo uma tensão interfacial mínima, o que favorece a formação das nanoemulsões (FERNANDEZ, 2004; IZQUIERDO, 2004).

Pelo método de EPI, altera-se a fração volumétrica das fases, causando a transição da curvatura do tensoativo. Para formar uma emulsão O/A adiciona-se continuamente a fase aquosa sobre a fase oleosa, formando inicialmente gotículas de água na fase oleosa contínua, até que haja inversão espontânea da curvatura, fazendo com que a emulsão A/O passe para O/A (FERNANDEZ, 2004; TADROS, 2004; SALAGER, 2004; LIU, 2006).

2.5 – Esqualano

O esqualeno é um hidrocarboneto triterpênico linear precursor do colesterol que está presente em vários tecidos, principalmente no fígado de tubarões e outros peixes.

O esqualano é obtido pela hidrogenação do esqualeno tendo um produto final totalmente saturado, logo não está sujeito a auto-oxidação. É um óleo não tóxico, até porque é encontrado em pequenas quantidades nas secreções sebáceas, tornando-o um óleo seguro para o desenvolvimento de formulações de aplicação tópica (Anthony C., 1999).

Conhecido por ser um antioxidante natural, esta atividade está relacionada com o mecanismo de defesa ao estresse oxidativo.

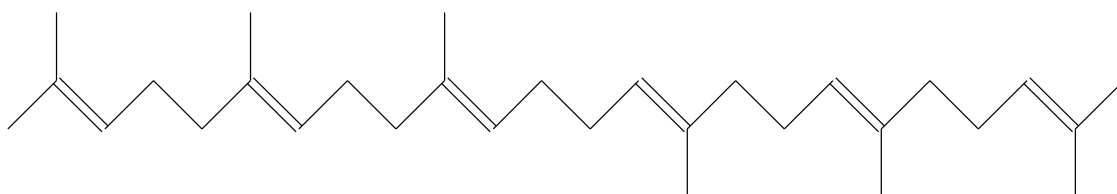


Figura 3: Estrutura química do Esqualeno.

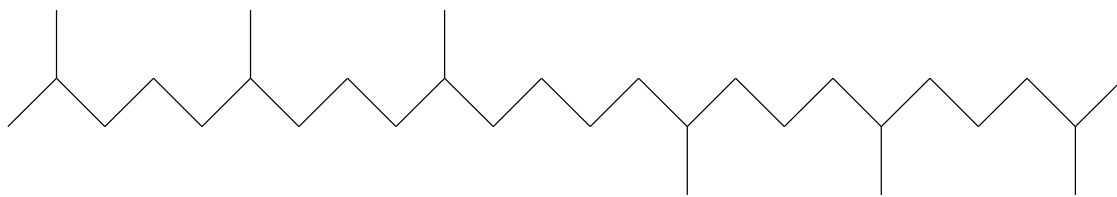


Figura 4: Estrutura química do Esqualano.

Em 1998 Binks et al. estudaram emulsões contendo esqualano formadas a partir do método de alta energia, neste estudo observaram que não houve mudança na distribuição do tamanho das partículas, indicando ausência de fenômenos de coalescência e de maturação de Ostwald.

Izquierdo et al. em 2002 demonstraram que nanoemulsões de isohexadecano formadas pelo método de inversão de fases se tornavam mais estáveis quando esqualano era adicionado à fase oleosa.

2.6 – Radicais livres

Os radicais livres são pequenas moléculas instáveis, produzidas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio extremamente reativo, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa. A principal fonte de radicais livres produzidos no organismo vem do metabolismo normal do oxigênio.

Essas moléculas instáveis também podem ser formadas pelos efeitos do sol, contaminação por tabaco e bebida alcoólica, podendo danificar as membranas das células, provocando efeitos negativos sobre a pele e acelerando o processo do envelhecimento, devido à morte ou ao mau funcionamento das mesmas. Estima-se que cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios ultravioletas e pelos radicais livres formados devido à exposição a estes (BUCHLI, 2002).

Os radicais livres atacam as células na parte superficial da epiderme degradando os fibroblastos da derme e podendo, inclusive, lesar a cadeia de DNA, proteínas, carboidratos, lipídios e as membranas celulares na parte mais profunda da epiderme, causando até mesmo câncer nos casos mais graves. (BUCHLI, 2002; CHORILLI, 2007).

Devido à força das ligações que mantêm as moléculas de água juntas nos sistemas vivos o radical livre hidroxila normalmente não ocorre. Porém, quando uma pessoa é exposta à radiação, essas ligações podem se romper, gerando radicais hidroxila. Se estes radicais atacarem o DNA, ocorrem reações em cadeia causando danos e mutações no material

genético ou até mesmo o rompimento dos filamentos de DNA (BUCHLI, 2002; HALLIWELL & GUITTERIDGE, 2000).

Em termos gerais, o dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação química conhecida como oxidação, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (YOUNGSON, 1995).

O interesse na atividade antioxidante de extratos de plantas ou de substâncias isoladas de plantas tem crescido, devido ao fato de que os radicais livres têm sido relacionados a certas doenças, bem como ao processo de envelhecimento (WILLCOX, 2004).

As propriedades antioxidantes de certas espécies de plantas têm uma gama de aplicações na perspectiva da saúde humana. A prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares tem sido associada com a ingestão de frutas, verduras ou chás ricos em antioxidantes naturais (JOHNSON, 2001), o que sugere que uma maior ingestão destes compostos deve reduzir o risco de mortalidade por estas doenças.

Em busca de novas fontes de antioxidantes, nos últimos anos algumas plantas medicinais têm sido amplamente estudadas para a sua atividade seqüestradora de radicais livres. No Brasil a grande biodiversidade é um fator importante para a busca por novas plantas com substâncias que apresentem tal atividade.

2.7 – *Syagrus romanzoffiana*

A família Arecaceae apresenta distribuição predominantemente pantropical, incluindo cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 40 gêneros e 200 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os frutos de palmeiras geralmente são fontes de carotenóides, como *Mauritia vinifera* e *Astrocaryum vulgare* que tem, em média, respectivamente, 360 e 107 μ g.g⁻¹ de β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996), o licuri (*Syagrus coronata*) 26,1 μ g.g⁻¹ (CREPALDI et al., 2001) e o bacuri (*Scheelea phalerata*) 17,28 μ g.g⁻¹ (HIANE et al., 2003).

O gênero *Syagrus* (Arecaceae) é endêmico da América do Sul, encontrado principalmente nos estados brasileiros da Bahia e Minas Gerais, é constituído por cerca de 42 espécies e oito híbridos naturais, dos quais sete são inter-específicos e um inter-genérico (NOBLICK, 1996).

Syagrus romanzoffiana conhecido popularmente como jerivá, gerivá, Coqueiro-gerivá, coqueiro, coco-de-cachorro, baba-de-boi, coco-de-catarro, coco-de-babão, é a espécie com a distribuição mais ampla do gênero, ocorrendo desde a Bolívia e o estado brasileiro da Bahia

até o Uruguai e Argentina, sendo mais abundante no sul e leste do Brasil (GLASSMAN, 1987). Por ser altamente decorativa e apresentar facilidade de transplante quando adulta, *S. romanzoffiana* é a palmeira mais usada na arborização de ruas e avenidas em todo o Brasil (LORENZI, 1992; LORENZI, 1996)

O jerivá, *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, é uma palmeira de 10 a 15 m de altura, que apresenta inflorescência em cacho pendente e frutos globosos com polpa fibrosa e carnosa de cor amarela, A reprodução é sexuada, apresentando inflorescência em cacho pendente, ramificado, de até 150 cm de comprimento, com centenas de ráquias (LORENZI, 2002).



Figura 5: Foto da palmeira *Syagrus romanzoffiana*.

Syagrus romanzoffiana tem a zoocoria como processo de dispersão de seus frutos (Olmos et al., 1999). É uma palmeira que fornece alimento para os frugívoros, ocorrendo conseqüentemente à dispersão das sementes para locais a maiores distâncias, onde possam ocorrer a germinação e colonização. Seus frutos são ricos em carboidratos e são amplamente consumidos por uma grande diversidade de aves e mamíferos (Guix & Ruiz, 2000).

Seus frutos do tipo drupa são globosos ou ovóides, de cor amarela ou alaranjada, com um fino exocarpo e um mesocarpo fibroso, suculento e adocicado que envolve uma única

semente. Um quilo de frutos contém cerca de 140 unidades (LORENZI, 2004), a semente é protegida por um endocarpo lenhoso. O néctar floral, frutos e sementes do jerivá são explorados por uma larga variedade de animais, sendo uma potencial espécie-chave em fragmentos de Mata Atlântica (ALVES-COSTA, 2004).

Tabela 1: Classificação botânica da palmeira *Syagrus romanzoffiana*

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophita
Divisão	Magnoliophita
Classe	Liliopsida
Ordem	Arecales
Família	Arecaceae
Tribo	Cocoeae
Gênero	<i>Syagrus</i> Mart.
Espécie	<i>Syagrus romanzoffiana</i>

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver nanoemulsões do tipo O/A pelo método de inversão de fases, que envolve baixa energia de emulsificação, tendo como fase oleosa o esqualano e o par de tensoativos álcool oléico etoxilado: Oleth-3 – álcool oleílico 3OE e o álcool oléico 20 OE, que são tensoativos não iônicos, incorporando os extratos da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana* na fase oleosa, além de realizar estudos fitoquímicos e avaliar a atividade antioxidante destes extratos.

3.1 – Objetivos específicos

- Realizar os estudos fitoquímicos dos extratos da polpa dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Syagrus romanzoffiana* utilizando o reagente DPPH.
- Desenvolver e caracterizar nanoemulsões do tipo O/A contendo os extratos de *Syagrus romanzoffiana*.
- Comparar a liberação *in vitro* do ácido retinóico nanoemulsionado com uma emulsão comercial.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – MATERIAIS

4.1.1 – Fase oleosa

A fase oleosa utilizada foi o óleo de esqualano da empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda .

4.1.2 – Fase aquosa

A fase aquosa utilizada foi água recém destilada.

4.1.3 – Tensoativos

Como tensoativos foram utilizados dois derivados polietoxilado do álcool oleico: Oleth-3 – álcool oleico 3OE (Volpo N3) e o álcool oleico 20 OE (Volpo N20). Ambos foram gentilmente cedidos pela empresa Croda do Brasil Ltda.

Estrutura química:



4.1.4 – *Syagrus romanzoffiana*

Os frutos de *Syagrus romanzoffiana* foram colhidos na cidade de Viçosa, no estado de Minas Gerais, na região conhecida como Zona da Mata. A coleta ocorreu em janeiro de 2008.

4.1.5 – Ácido retinóico (tretinoína)

Ácido retinóico grau farmacêutico foi obtido da empresa Pharma Nostra Comercial Ltda.

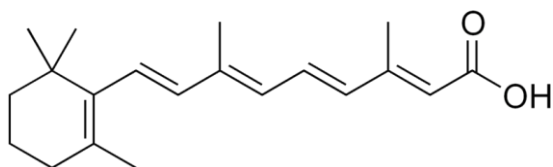


Figura 6: Estrutura química do ácido retinóico.

4.1.6 – DPPH

O reagente DPPH (2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil) foi adquirido da empresa Sigma.

4.1.7 – Ácido retinóico creme comercial

O produto comercial utilizado no estudo de liberação foi o VITANOL-A[®], produzido pelos Laboratórios Stiefel Ltda. Este creme apresenta concentração de 1,0 mg/g de tretinoína (ácido retinóico).

4.2 – MÉTODOS

4.2.1 – *Syagrus romanzoffiana*

Um cacho de frutos de *Syagrus romanzoffiana* foi coletado em janeiro de 2008, na cidade de Viçosa. Os frutos foram separados, limpos e colocados em estufa de secagem com ventilação forçada e regulada à temperatura de 35°C. Após uma semana de secagem, uma parte dos frutos foi descaroçada, sendo a casca e polpa, fragmentadas para posterior obtenção de extratos (Figura 6).

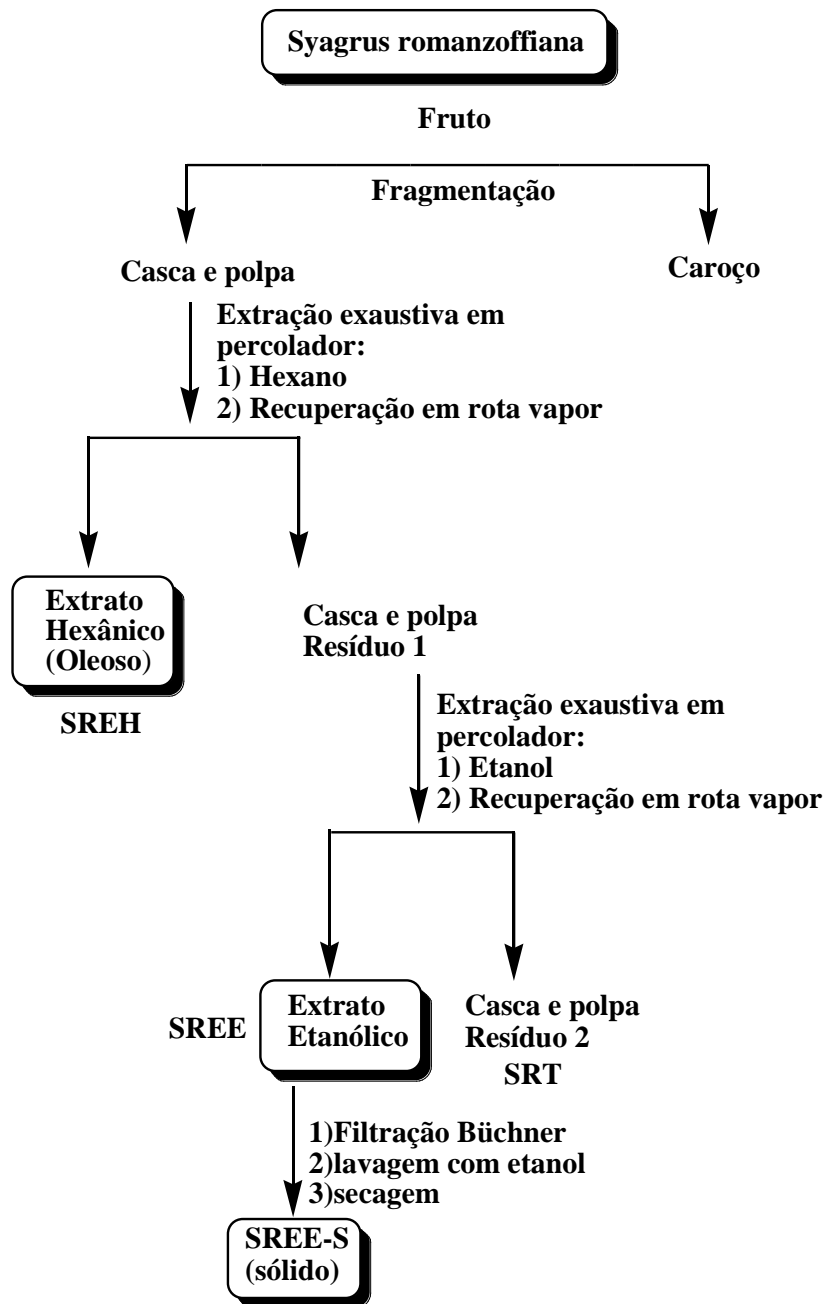


Figura 7: Esquema do processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico de *S. romanzoffiana*.

4.2.2 – Obtenção de extratos da casca e polpa

Casca e polpa (1410g) de *S. romanzoffiana* foram fragmentadas e submetidas à extração exaustiva, em percolador com hexano. De 48 em 48 horas, o solvente extrator foi removido, recuperado em evaporador rotatório, sendo em seguida reutilizado no processo de percolação, até completa extração. O processo foi repetido utilizando etanol para obtenção de

extrato etanólico. Foram obtidos os extratos hexânico (EH, 15,25 g) e etanólico (EE, 230,26 g).

Para a identificação dos extratos da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana* foi adotado o seguinte sistema de siglas: “S” para *Syagrus*, “R” para *romanzoffiana*, “E” para extrato, “H” para extrato hexânico, e um segundo “E” para extrato etanólico e “T” para representar o resíduo vegetal (torta) obtido após as extrações com estes dois solventes de diferentes polaridades.

Assim, tem-se:

- SREH - Extrato hexânico da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana*
- SREE - Extrato etanólico da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana*
- SREE-S - Material sólido obtido após lavagem e secagem do extrato etanólico da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana*.
- SRT - Resíduo vegetal (torta) da polpa dos frutos de *S. romanzoffiana* após todos os processos de extração com solventes orgânicos.

4.2.3 – Análise fitoquímica dos extratos de *Syagrus romanzoffiana*

4.2.3.1 – Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de sílica gel 60G de 0,25 mm de espessura, em suporte de vidro, onde as amostras foram aplicadas e eluídas com os solventes puros ou em misturas de diferentes polaridades. Após eluição, as placas foram reveladas em uma cuba de vidro saturada com vapor iodo.

Para a realização de CCDs preparativas (0,50 mm de espessura), primeiramente foi escolhido o solvente, ou a mistura deles, que gerou o melhor perfil de separação dos constituintes. Após esse procedimento, a amostra em questão foi aplicada em várias placas e eluída. Em seguida, a sílica correspondente em cada placa foi raspada de acordo com o Rf de cada constituinte da amostra, sendo respectivamente transferido para um recipiente devidamente pesado e rotulado.

A sílica contendo o constituinte foi tratada com solvente extrator, filtrada em papel de filtro. Para comprovação da sua pureza, cada solução foi submetida à CCD. Cada solução foi evaporada em temperatura ambiente e o resíduo submetido à análise espectrométrica.

4.2.3.2 – Cromatografia em coluna clássica do extrato hexânico

Nos processos de cromatografia em coluna clássica (CCC) foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 Mesh). A proporção de amostra aplicada na coluna, em relação a sílica foi de 1:50. Foi aplicado 0,700 g de amostra na coluna com 35 g de sílica e recolhido 55 frações de 30 mL cada uma, utilizou-se como fase móvel gradiente crescente de polaridade dos solventes, Hexano puro, Hexano:Acetato de Etila até Acetato de Etila puro, grau P.A. As frações obtidas na separação foram concentradas em temperatura ambiente (Tabela 2).

O perfil cromatográfico de cada fração foi observado por CCD. As que apresentaram perfil semelhante foram reunidas fornecendo 12 grupos, que receberam a denominação de Hg para a continuação dos estudos. Cada grupo foi submetido à CCD preparativa para tentar isolar os constituintes.

Tabela 2: Fase móvel utilizada para cada grupo de frações e peso dos grupos após a cromatografia em coluna clássica

Fase móvel	Frações	Grupos	Peso (mg)
Hexano	1-6	Hg-1	22
	7-9	Hg-2	15
	10-16	Hg-3	24
Hexano:acetato de etila 2%	17-20	Hg-4	17
	21-23	Hg-5	42
	24-26	Hg-6	24
Hexano:acetato de etila 4%	27-32	Hg-7	43
Hexano:acetato de etila 8%	33-38	Hg-8	33
Hexano:acetato de etila 1:1	39-42	Hg-9	52
Acetato de etila	43-47	Hg-10	34
	48-50	Hg-11	44
	51-55	Hg-12	46

Os grupos submetidos às separações por CCD preparativa foram escolhidos baseando-se em dois critérios: massa e perfil da fração em CCD (o grupo cuja massa era muito pequena e apresentou-se como mistura complexa não foi trabalhado).

Os grupos considerados de maior grau de pureza foram secados a 60°C em aparelho de Abderhalden durante oito horas.

Em seguida estes grupos foram submetidos às análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e de ^{13}C).

4.2.3.3 – Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo de transmissão em um espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum GX. As amostras foram trituradas, dispersas em KBr e prensadas na forma de pastilhas. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000-380 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.2.3.4 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em equipamento Bruker Advance DRX 400 e DPX 200 com transformada de Fourier, do Departamento de Química da UFMG. Foi utilizado como padrão o TMS (^1H , 400,12 e 200,13 MHz, ^{13}C , 100 e 50,288 MHz, $\delta=0$, interno). Os espectros de hidrogênio e carbono foram obtidos utilizando solvente deuterado apropriado (CDCl_3 ou D_2O).

4.2.3.5 – Cromatografia gasosa (CG-FID)

O extrato hexânico foi submetido a análise em cromatograma gasosa equipado com detector de ionização de chama, Varian modelo CP-3380, utilizando coluna da Hewlett Packard, a HP-5 (SE54) de 25 m de comprimento por 0,2 mm de diâmetro interno e 0,33 μm de espessura do filme de 5% de difenilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano.

4.2.4 – Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Syagrus romanzoffiana*

Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de seqüestrar o radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), que é estável e de coloração roxa à temperatura ambiente. Foram utilizados 2,5 mL de soluções dos extratos em etanol, de várias concentrações, misturadas com 1,0 mL da solução de DPPH em etanol a 0,3 mM.

A absorbância foi medida em 518 nm, em espectrofotômetro da marca Thermo Spectronic, modelo Helios α , após os tempos de 30 e 60 minutos de reação à temperatura ambiente (25°C). Solução dos extratos (2,5 mL) com etanol (1,0 mL) foi utilizada como branco. Como controle negativo foi utilizado 1,0 mL da solução de DPPH 0,3mM com 2,5 mL de etanol.

O decréscimo na absorbância das soluções foi medido e calculado a partir da fórmula:

$$\% I = (ABS_{controle} - ABS_{amostra} / ABS_{controle}) \times 100$$

Onde:

%I é o percentual de inibição

ABS_{controle} é a absorbância do controle negativo

ABS_{amostra} é a absorbância da amostra diminuído o valor da absorbância do branco de cada concentração dos extratos.

A partir dos dados obtidos foi feito um gráfico relacionando a porcentagem de inibição com os valores das concentrações dos extratos obtidos por regressão linear, para determinar a concentração que causa 50% de inibição (IC50%).

4.2.5 – Preparo das emulsões pelo método de EPI utilizando aquecimento

No preparo das emulsões foram preparadas pelo método de EPI, aqueceu-se a fase aquosa e oleosa separadamente a $75 \pm 5^\circ\text{C}$, sob agitação verteu-se a fase aquosa sob a oleosa lentamente até o sistema atingir a temperatura ambiente 25°C.

4.2.6 – Determinação do EHL requerido para o óleo Esqualano

A determinação do valor de EHL requerido pelo esqualano foi realizada a partir de 6,6 (valor do EHL do tensoativo lipofílico/Volpo N3) até o valor de 15,5 (valor do EHL do tensoativo lipofílico/Volpo N20).

A quantidade de tensoativo empregado foi de 5,0 e 10% m/m, e a quantidade de esqualano foi fixada em 10% (p/p).

Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidrofílicos e lipofílicos necessários para obtenção de cada valor de EHL foi utilizada a fórmula:

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

Onde:

A é o componente hidrofílico

B é o componente lipofílico

As quantidades de tensoativos utilizados em cada EHL estão representados na tabela 3.

Tabela 3: Concentração de tensoativos requeridos na determinação do EHL requerido para o óleo esqualano.

Valor de EHL	Tensoativo lipofílico Volpo N3 % (p/p)	Tensoativo hidrofílico Volpo N20 % (p/p)
6,60	5,0	-
8,38	4,0	1,0
9,27	3,5	1,5
10,16	3,0	2,0
11,05	2,5	2,5
11,94	2,0	3,0
13,72	1,0	4,0
15,50	-	5,0

Legenda: EHL: Equilibrio Hidrofílico-Lipofílico, p/p: peso em peso

4.2.7 – Preparo das nanoemulsões

Para o preparo das nanoemulsões foi fixado a porcentagem de fase oleosa em 10% (p/p), utilizando o sistema tensoativo em 5% e 10%.

A formulação base teve como constituinte da fase oleosa apenas o óleo de esqualano, sendo que após os estudos preliminares das formulações e da atividade antioxidante dos extratos de *Syagrus romanzoffiana*, estes foram adicionados à fase oleosa com concentração 10 vezes maior do que a concentração de inibição de 50% no teste de atividade antioxidante utilizando o reagente DPPH, e foram identificadas com a letra “H”, quando o extrato incorporado foi o hexânico e “E” para extrato etanólico.

As formulações contendo ácido retinóico para o teste de liberação *in vitro*, foram formuladas com a mesma concentração do produto comercial (0,1% p/p), e a denominação nas formulações que apresentavam ácido retinóico foi “AR”.

4.2.8 – Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos

As formulações foram obtidas pelo método descrito anteriormente variando-se a velocidade de agitação, a 300 rpm, a 600 rpm e 1200 rpm (agitador Fisatom, modelo 713D), as formulações foram analisadas macroscopicamente além de análise granulométrica, a fim de estabelecer a melhor velocidade de agitação. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.9 – Determinação da temperatura de inversão de fases

A temperatura de inversão de fases foi determinada com o auxílio de um condutivímetro (Instrutherm, modelo CD-820), com aquecimento da amostra em chapa metálica sob temperatura controlada por um termômetro.

As leituras foram realizadas a partir da temperatura ambiente 25°C e a cada incremento de 5°C, até a temperatura final de 90°C.

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

4.2.10 – Determinação do valor de pH

O peagâmetro (Lutron, modelo PH-221) foi previamente calibrado utilizando as soluções tampão padrões e o pH foi medido inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra em temperatura ambiente de 25°C (ANVISA, 2006). O teste foi realizado em triplicata.

4.2.11 – Caracterização da distribuição granulométrica e do potencial zeta

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada através do equipamento N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter). Para a determinação granulométrica, 20 µL das nanoemulsões foram diluídos em 4980 µL de água ultra pura (MilliQ – Millipore), à temperatura ambiente. O ângulo de incidência do laser na amostra foi de 90°. Para obter a média e o desvio padrão a análise foi feita em triplicata.

Para a determinação do potencial zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). Na determinação dos valores de potencial zeta foi utilizada a técnica de microeletroforese associada a anemometria de laser Doppler. Para as análises 10 µL das nanoemulsões foram diluídos em 9990 µL de solução de NaCl 1,0 mM em água ultra pura (MilliQ – Millipore), a fim de obter suspensões com número adequado de partículas para a análise. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.12 – Avaliação da estabilidade preliminar

4.2.12.1 – Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada vinte e quatro horas após a manipulação da emulsão sendo que foram analisados os sinais de instabilidade macroscópica, como separação de fases e analisados aspectos próprios de sistemas nanoemulsionados, como fluidez, translucidência e reflexo azulado. Nos testes de estabilidade utilizou-se a seguinte nomenclatura:

N = Normal, sem alteração; **CL** = Cremeação leve;

CI = Cremeação intensa; **SF** = Separação de fases

4.2.12.2 – Avaliação microscópica

Para a avaliação microscópica uma gota de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro e em seguida coberta com uma lamínula. A lâmina foi analisada no microscópio da marca Opton, modelo TNB-40T-PL. Foi avaliada a homogeneidade e morfologia da dispersão.

Para determinar se havia ocorrência de regiões de anisotropia, que são características de fase líquido-cristalina lamelares, as nanoemulsões foram submetidas a análise sob luz polarizada.

4.2.12.3 – Centrifugação

A quantidade de 3,0 g foi acondicionado em ependorf e submetido à velocidade de 3000 rpm por 30 minutos em Centrifuga Eppendorf, modelo 5415 D. Em seguida, o material centrifugado foi analisado macroscopicamente quanto à cremeação e separação de fases. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.12.4 – Estresse térmico

As emulsões foram submetidas a aquecimento em banho-maria (Thermomix BM 18 BU da Braun. Biotech Internacional, Alemanha) a faixa de temperatura de 40 a 80°C, sendo o aumento da temperatura de 5 em 5°C, mantendo-se cada temperatura por 30 minutos.

As emulsões foram macroscopicamente analisadas quanto à ocorrência de cremeação e separação de fases após cada aumento de temperatura.

4.2.13 – Determinação do comportamento reológico das formulações

As determinações foram realizadas em Reômetro (Brookfield, modelo RV-III) tipo cone/placa, acoplado a um Software Rheocalc versão V 3.0, utilizando o spindle CP40 e 1,0 g de amostra a 25°C. As medidas foram feitas utilizando velocidade de rotação de 1 a 250rpm, com variação em intervalo de 50 em 50rpm, para se obter uma curva ascendente. O procedimento foi repetido no sentido inverso, com velocidades progressivamente decrescentes (250-1rpm), para se obter a curva descendente.

4.2.14 – Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração de Ácido Retinóico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As condições cromatográficas definidas abaixo foram utilizadas na determinação da concentração de AR, por CLAE:

Fase móvel:	Metanol : Água 0,5% de ácido acético glacial (90:10)
Fluxo:	1,2 mL/min
Volume de injeção:	10 µL
Detecção:	350 nm
Temperatura:	30°C
Equipamento:	Waters Alliance 2695, Detector UV-vis 2996
Coluna:	C18, Macherey-Nagel (150mm x 4,6mm x 3µm)

A fase móvel foi constituída de metanol grau HPLC e água ultra pura (MilliQ – Millipore) contendo 0,5% de ácido acético glacial, ambas as fases foram previamente filtradas em membrana de celulose de 0,45 µm e degaseificada durante 1 hora em banho ultra-som.

Curva analítica do ácido retinóico

Foi pesado, exatamente, o equivalente a 10,0 mg de ácido retinóico e dissolvido em 10,0 mL de metanol (1,0 mg/mL). Alíquotas desta solução foram diluídas em metanol para obter concentrações correspondentes a 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0, 75,0 e 100,0 µg/mL. As soluções foram analisadas por CLAE-UV e os resultados obtidos foram relacionados em um gráfico da concentração da solução em função da área sob pico. As análises foram efetuadas em triplicata (n=3) e uma curva média foi obtida.

Linearidade

A avaliação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi efetuada mediante a obtenção de três curvas autênticas, do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear (r^2).

Precisão e exatidão

Amostras com concentrações de ácido retinóico de 5,0, 25,0 e 75,0 $\mu\text{g/mL}$ foram injetadas em triplicata ($n=3$). A exatidão (E %) é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em termos percentuais. A precisão foi calculada a partir do coeficiente de variação (CV%).

4.2.15 – Teste de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir das formulações foi realizado em células de liberação do tipo Franz com área difusional de $1,15 \text{ cm}^2$, no compartimento doador uma amostra de 1,0 g de cada formulação contendo o ácido retinóico foi colocada sobre a membrana artificial de cada célula.

Foram utilizadas membranas de filtração de nylon com poros de $0,45 \mu\text{m}$, estas membranas são naturalmente hidrofílicas e resistentes.

O compartimento receptor, volume de 15,0 mL, foi preenchido com etanol em um sistema composto de três células individuais conectadas a um banho termostaticado a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sob agitação constante de 100 rpm por um período de 24 horas.

As membranas foram colocadas cuidadosamente entre o compartimento doador e o receptor, de forma que ficassem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram previamente umedecidas (1 hora antes do experimento) com a solução receptora.

Em períodos de tempos pré-determinados, todo o líquido do compartimento receptor foi coletado e imediatamente repostado. O ácido retinóico liberado foi quantificado por CLAE-UV através do método analítico previamente desenvolvido e validado.

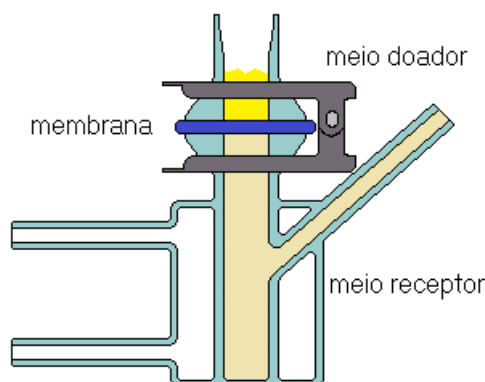


Figura 8: Esquema da célula do tipo Franz modificada utilizada no teste de liberação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 – Resultados e discussão

5.1 – Análise fitoquímica dos extratos dos frutos de *Syagrus romanoffiana*

O extrato hexânico da polpa dos frutos de *Syagrus romanoffiana* (SREH) (Figura 06) apresentou-se como um material oleoso, denso, de cor amarelada e solúvel em solventes orgânicos apolares. Devido a essas características e em função de já ser citado na literatura a presença de ácidos graxos em óleos obtidos de outras espécies de palmeiras, optou-se por submeter SREH a uma análise qualitativa por cromatografia gasosa. Através dessa análise foram detectados os ácidos graxos de cadeia longa: C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:0 (Figura 9, Tabela 4).

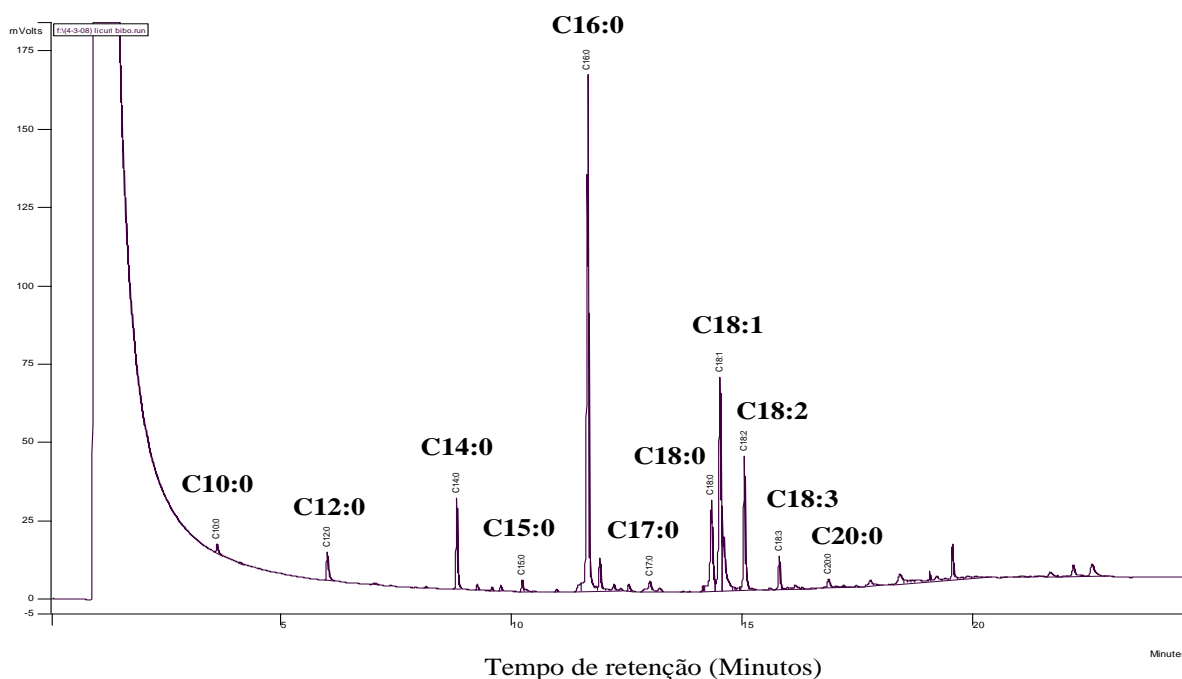


Figura 9: Cromatograma extrato hexânico da polpa dos frutos de *Syagrus romanoffiana* (SREH) obtido por CG coluna SE-54, em condição isotérmica a 280 °C, com temperatura do detector a 280 °C e do injetor a 270 °C.

Tabela 4: Ácidos graxos de cadeia longa detectados no extrato hexânico de *Syagrus romanzoffiana* (SREH), por cromatografia gasosa

Ácido graxo	Nomenclatura	
	IUPAC	Comum
C10:0	Decanóico	Cáprico
C12:0	Dodecanóico	Láurico
C14:0	Tetradodecanóico	Mirístico
C15:0	Pentadodecanóico	-
C16:0	Hexadodecanóico	Palmítico
C17:0	Heptadodecanóico	Margárico
C18:0	Octadodecanóico	Estearico
C18:1	Cis-9-octadecenóico	Oléico
C18:2	Cis-9,12-octadecadienóico	Linoleico
C18:3	Cis-9,12,15-octadecatrienóico	Alfa linolenico
C20:0	Eicosanóico	Araquídico

A natureza alifática do extrato hexânico (SREH) também foi evidenciada pelo espectro no infravermelho através das bandas de absorção em 2915 e 2847 cm^{-1} correspondentes a estiramento de grupo alifático (ν CH), em 1471, 1376 e em 729-719 cm^{-1} , devido a deformações angulares de grupo $(\text{CH}_2)_n$, sendo este último sinal indicativo de cadeia de carbonos, onde $n \geq 4$. O sinal em 1736 cm^{-1} foi atribuído à presença de carbonila de éster (SILVERSTEIN, 2004) (Figura 10).

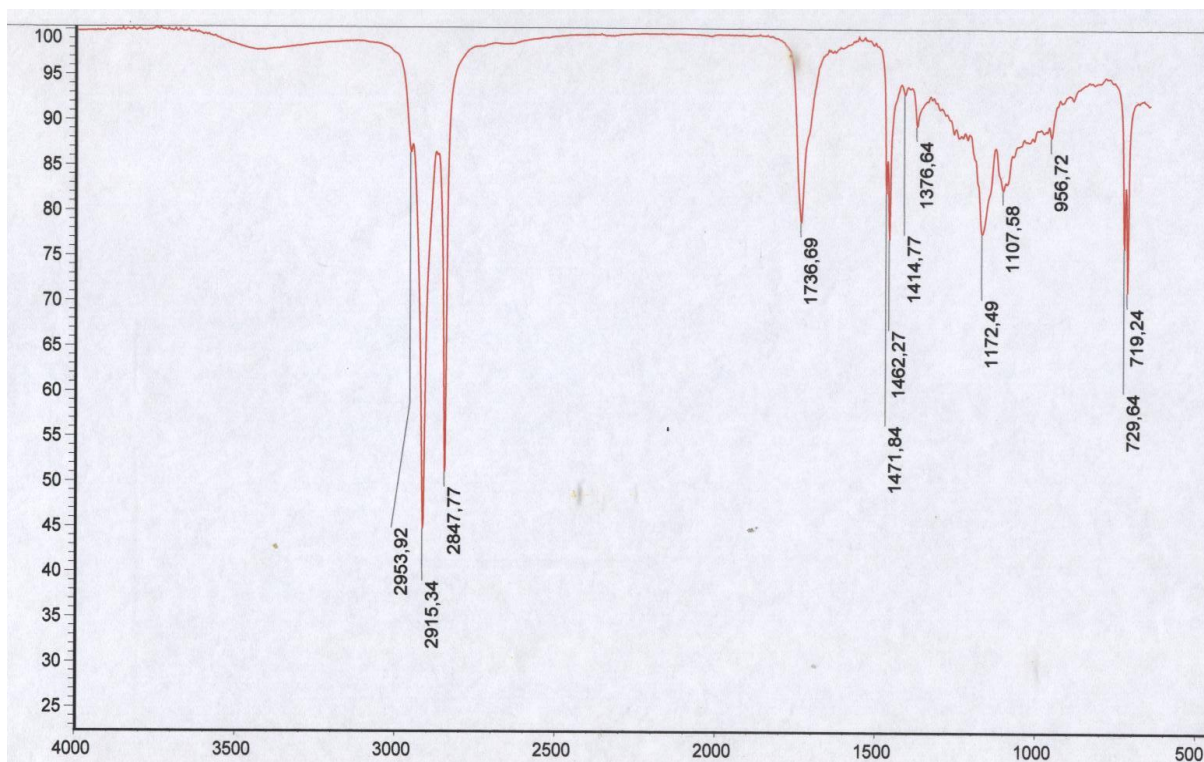


Figura 10: Espectro do extrato hexânico da polpa dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (SREH) obtido por espectrometria na região do infravermelho (Filme, cm^{-1}).

Para tentar isolar algum constituinte, uma amostra de SREH foi fracionada por cromatografia em coluna clássica de sílica gel. Todas as frações obtidas de SREH apresentaram-se como um material pastoso, com ponto de fusão abaixo de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e também, totalmente solúvel em solventes orgânicos apolares.

Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), utilizando eluentes de diferentes polaridades e visualização por luz ultravioleta ou revelação com vapor de iodo, indicou que algumas frações de SREH estavam constituídas por apenas um componente. Assim sendo, as frações rotuladas como Hg-1 a Hg-9 foram submetidas a espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C).

Após a evaporação do eluente, a fração Hg1 (22 mg) foi visualmente caracterizada como sendo um material pastoso e de cor esbranquiçada. Por CCDS verificou-se inicialmente que Hg1 estava constituída por um único componente. Em função disso, Hg1 foi submetida a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).

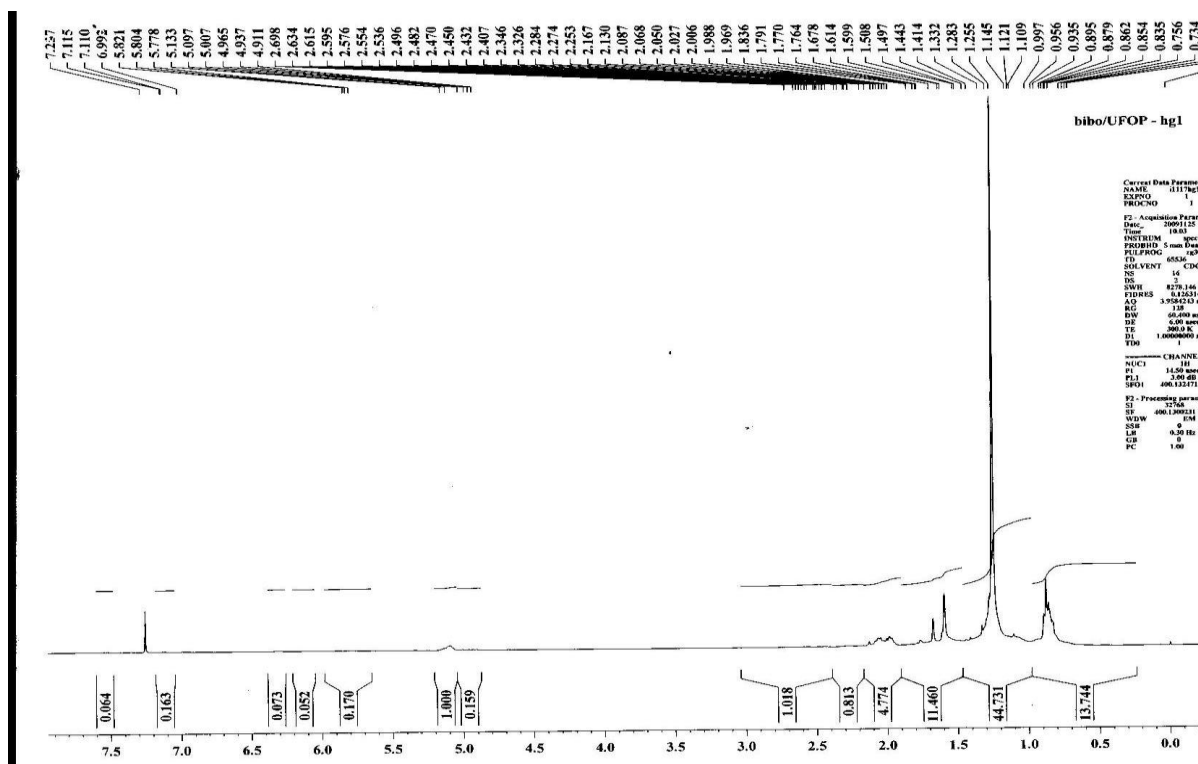


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg1, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

No espectro de RMN de ^1H da fração Hg1 (Figura 11), observou-se uma predominância de sinais na região entre δ_{H} 0,50 e δ_{H} 2,0, que são característicos de hidrogênios alifáticos. O sinal intenso centrado em δ_{H} 1,30 foi atribuído a presença uma cadeia de grupos metilênicos $(\text{CH}_2)_n$ (SILVERSTEIN, 2004). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados sinais de carbono em δ_{C} 131,24 e δ_{C} 124,32 correspondentes a dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$) e um conjunto de sinais entre δ_{C} 14,11 e δ_{C} 39,73 associados a grupos metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3) (Figura 12).

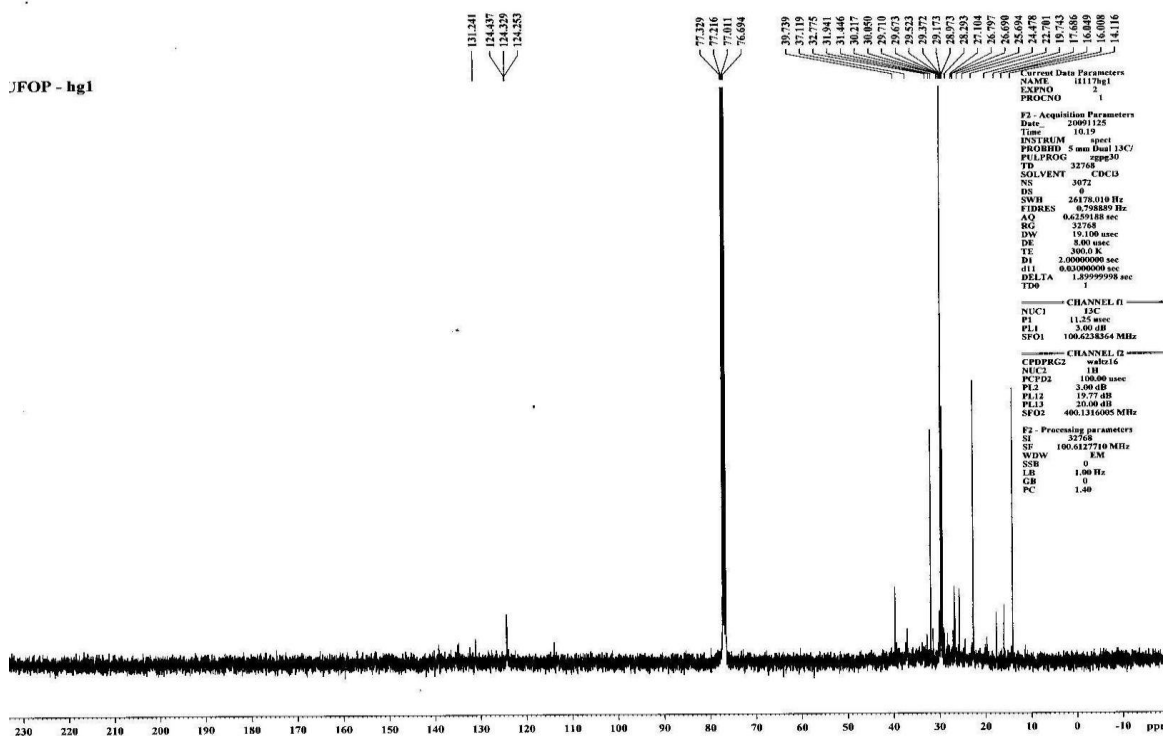


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg1, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

Ao analisar o subespectro DEPT-135 (Figura 13) foi confirmada a presença de grupo metínico (CH) em δ_{C} 124,32. A constatação de um sinal de maior intensidade em torno de δ_{C} 29,00, também demonstrou a existência de uma longa cadeia de grupos metilénicos $(\text{CH}_2)_n$ (SILVERSTEIN, 1998). A ausência do sinal em δ_{C} 131,24 caracterizaria a presença de um carbono não hidrogenado (C) o que permite suspeitar da existência de uma ramificação de carbonos, o que, no entanto, não foi possível comprovar. Em função dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C propôs-se que a fração Hg1 estava constituída por uma mistura de hidrocarboneto(s) de cadeia longa, sendo que um deles apresenta insaturação.

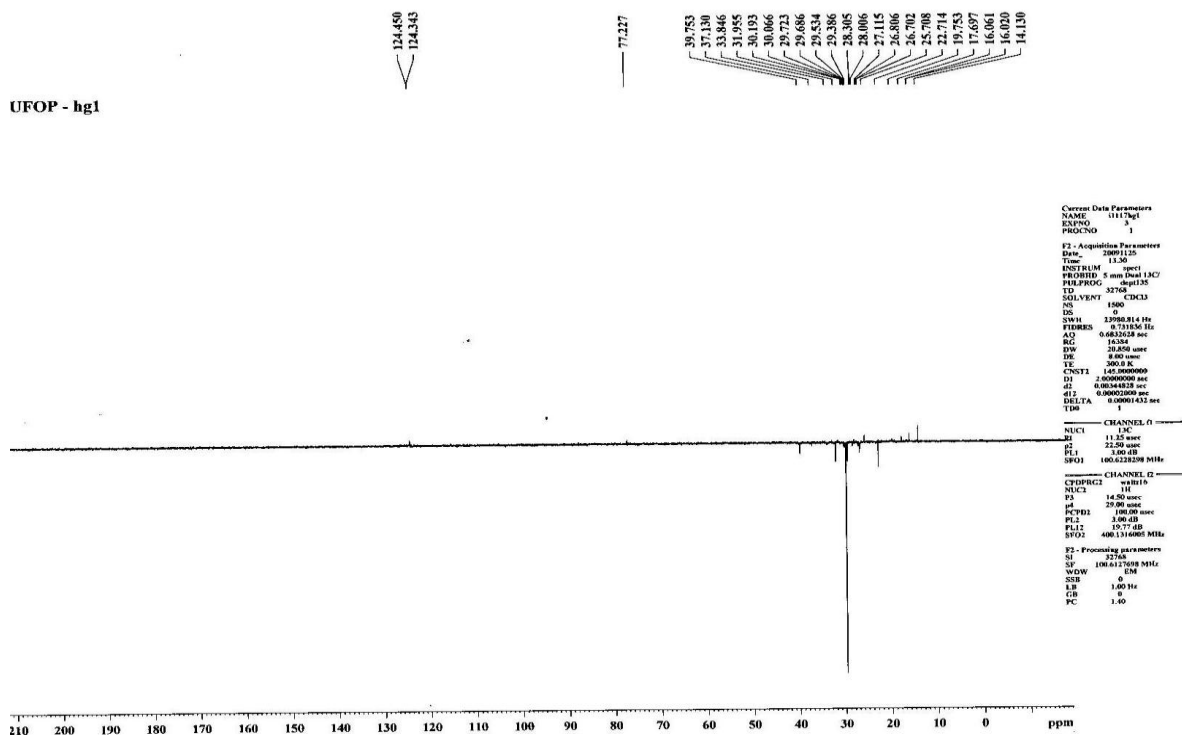


Figura 13: Subespectro DEPT-135 da fração Hg1 (CDCl₃, 400 MHz), obtida por cromatografia em coluna de SREH.

Após a evaporação do eluente, a fração Hg2 (15 mg) também foi visualmente caracterizada como sendo um material pastoso e de cor esbranquiçada. Por CCDS verificou-se inicialmente que Hg2 estava constituída por um único componente. Em função disso, Hg2 foi submetida a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).

O perfil do espectro de RMN de ¹H da fração Hg2 (Figuras 14) foi similar ao observado para a fração Hg1. No entanto, no espectro de RMN de ¹³C (Figura 14) e no subespectro DEPT-135 (*Distortionless enhancement by polarization transfer*) (Figura 15), não foram observados sinais de insaturação. Sugeriu-se que a fração Hg2 estava constituída por hidrocarboneto de cadeia longa, saturada.

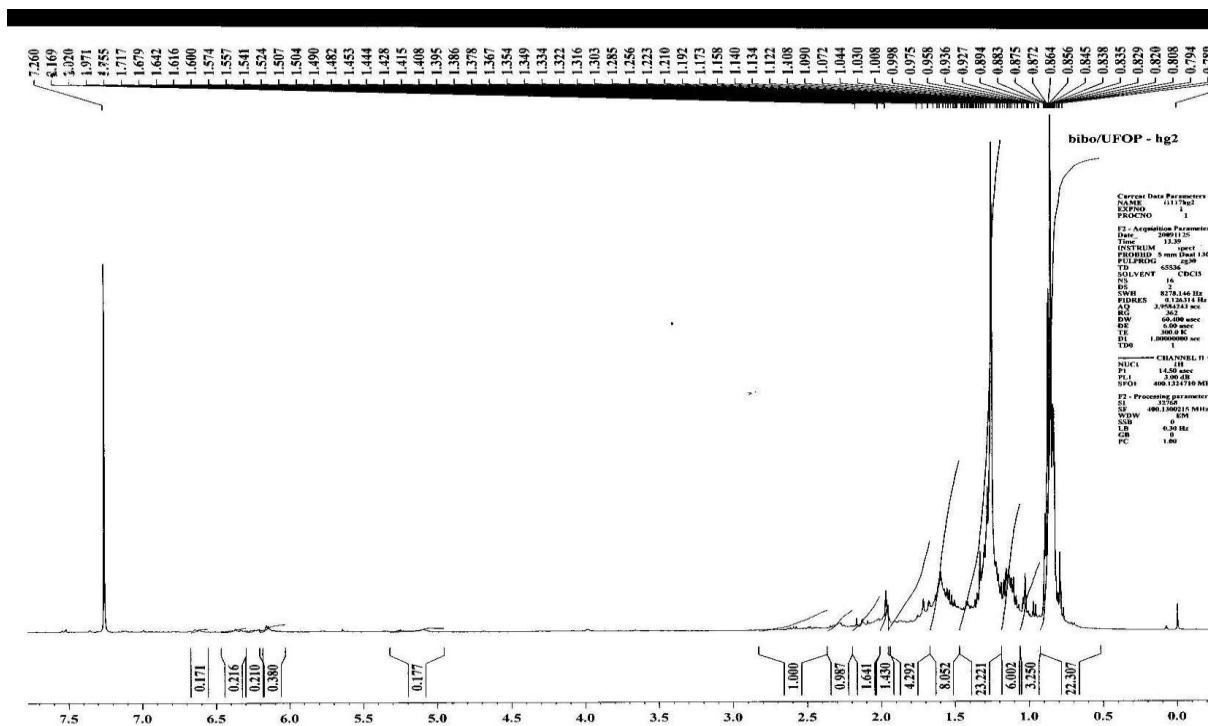


Figura 14: Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

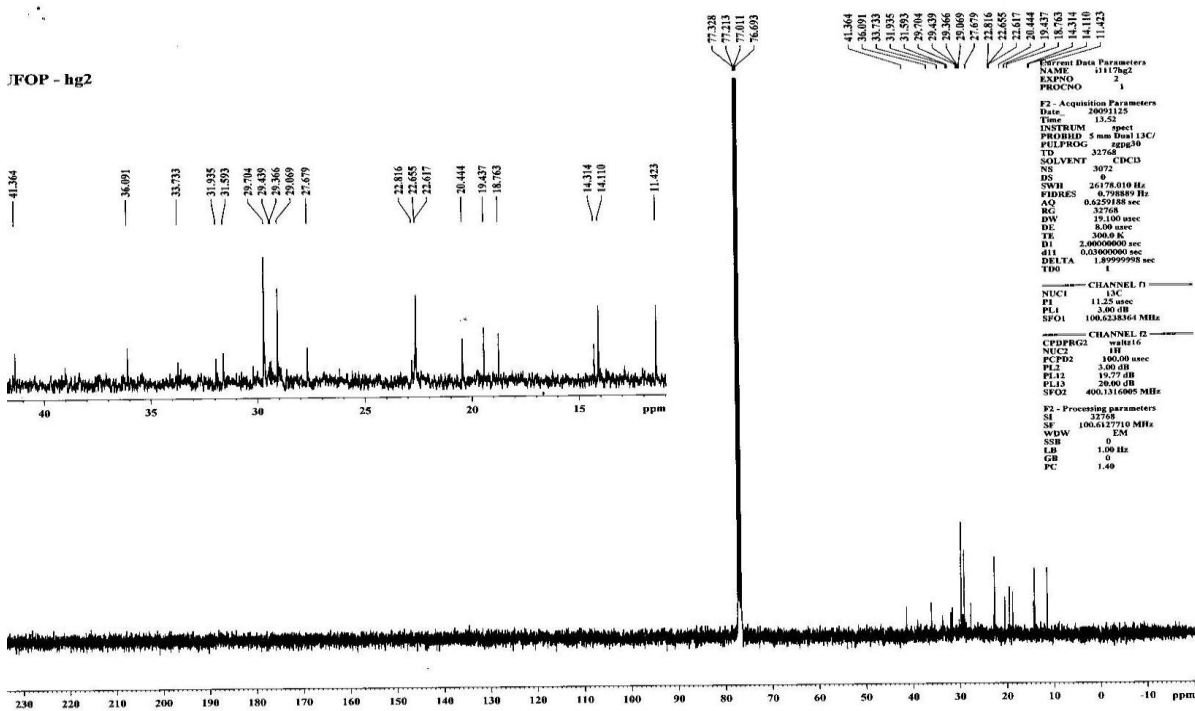


Figura 15: Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

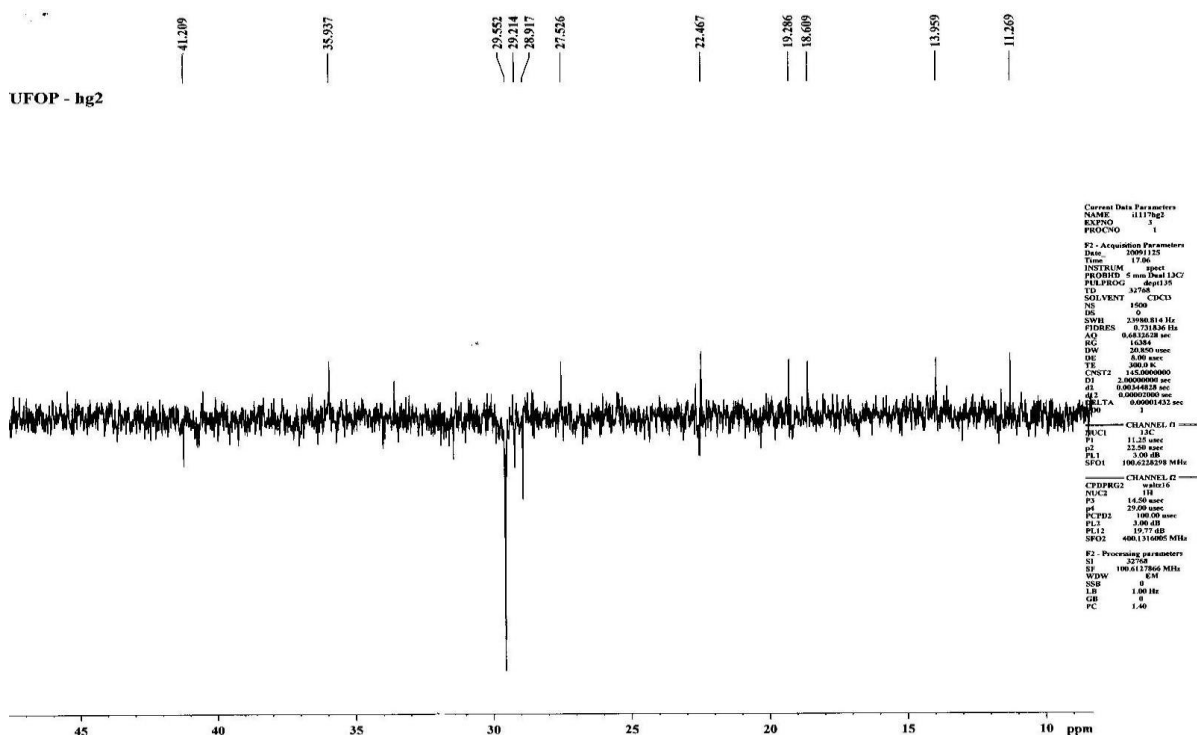


Figura 16: Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 400 MHz) da fração Hg2, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

A fração Hg6 (24 mg) foi purificada por CCS filtrante, utilizando uma mini-coluna de 1 cm de diâmetro interno por 10 cm de comprimento e CHCl_3 como eluente. Por essa filtração se obteve Hg6b (12 mg), de aspecto pastoso e cor esbranquiçada. Analisado por CCDS, verificou-se que Hg6b continha apenas um constituinte, mesmo quando eluída com solventes de diferentes polaridades. Assim sendo, a fração Hg6b foi enviada para espectrometria de RMN.

No espectro de RMN de ^1H de H6b (Figura 17) foram observados sinais de deslocamento químico (δ), em δ_{H} 5,27 correspondentes a hidrogênio carbinólico ($-\text{CH}-\text{OH}$) e em δ_{H} 4,15 que foi atribuído a hidrogênios metilênicos ligados a grupo ester ($\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$). Também foram observados sinais de $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ em δ_{H} 2,30 e em δ_{H} 2,10, sinal intenso de CH_2 entre δ_{H} 1,60 e δ_{H} 1,30 e de grupo metila em δ_{H} 0,88 (SILVERSTEIN, 2004).

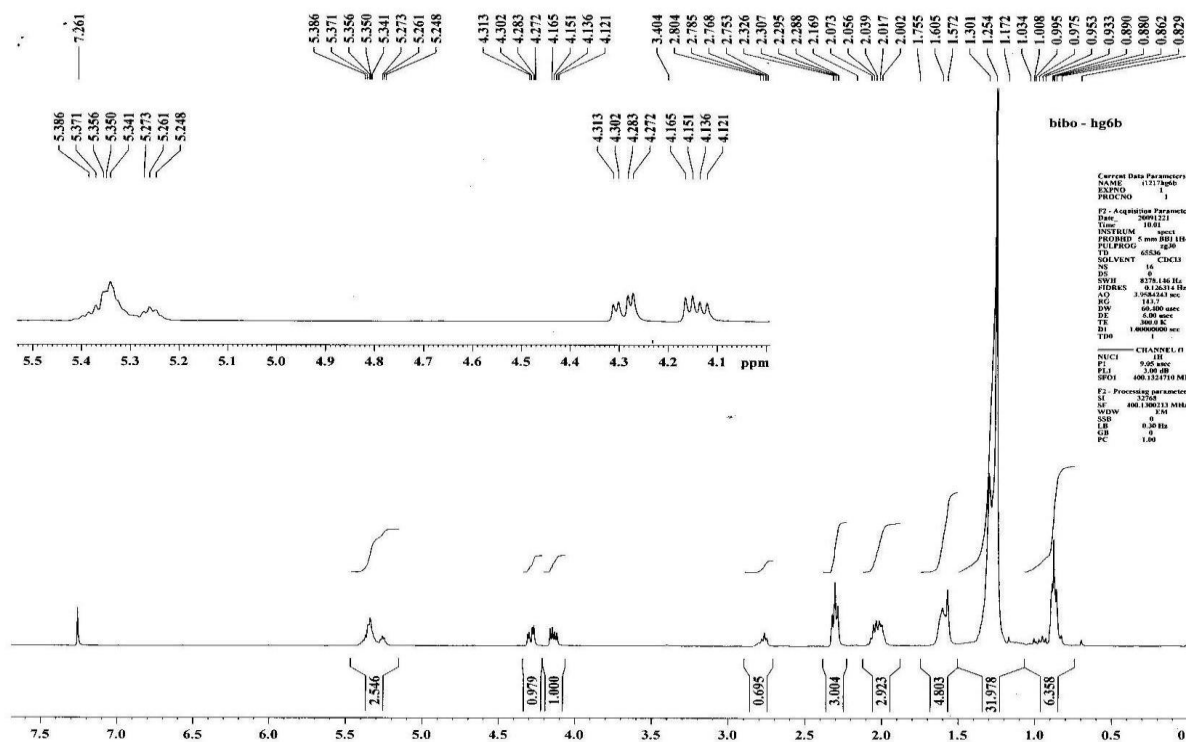


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 18) foi observado sinal de C=O em δ_C 173,29, sinal intenso próximo de δ_C 29,00, característico de cadeia longa de grupos metilênicos (CH₂)_n e a ausência de sinais de dupla ligação na região de δ_C 100,00 e δ_C 150,00 (SILVERSTEIN, 2004).

Em função desses dados, imaginou-se inicialmente tratar-se de um éster graxo de cadeia longa, o que seria condizente com os resultados do cromatograma obtido por CG para SREH (Figura 9).

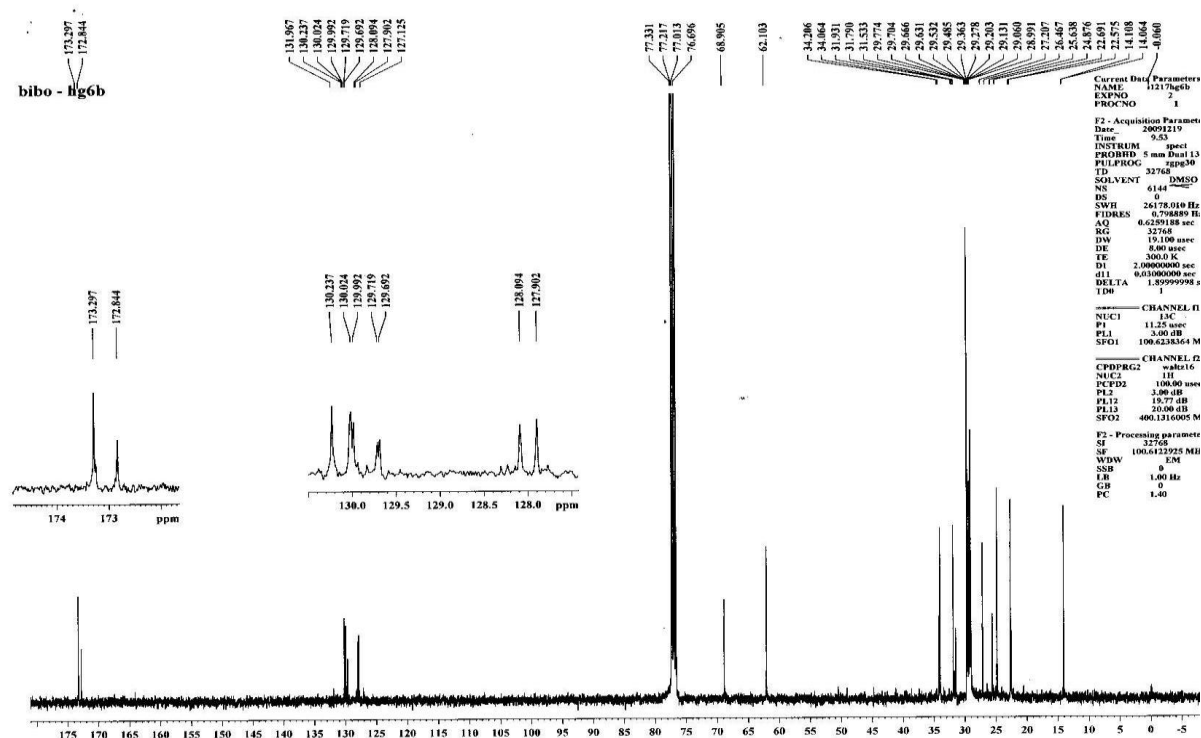


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

No subspectro DEPT-135 (Figura 19) foi observado somente um sinal em δ_{C} 14,04, correspondente a grupo metila (CH_3), um sinal em δ_{C} 68,90 atribuído a grupo metínico ligado a hidroxila (CH-OH) e um sinal intenso em δ_{C} 62,10 que foi associado a carbono metilênico ligado a oxigênio (O-CH_2 -). Também foram observados sinais de carbonila próximo de δ_{C} 173,29 e sinais de ligação dupla na região entre δ_{C} 131,96 e δ_{C} 127,12. A presença de um único sinal de grupo metila em δ_{C} 14,04 e a diferença de intensidade dos demais sinais induziram a uma nova tentativa de purificação por mini-coluna de sílica gel, obtendo-se Hg6b2, que foi submetido à nova espectrometria de RMN incluindo experimentos em duas dimensões (RMN-2D). Verificou-se o desaparecimento dos sinais correspondentes à dupla ligação e a manutenção dos demais sinais de carbono, o que demonstrou a eficiência do processo de purificação.

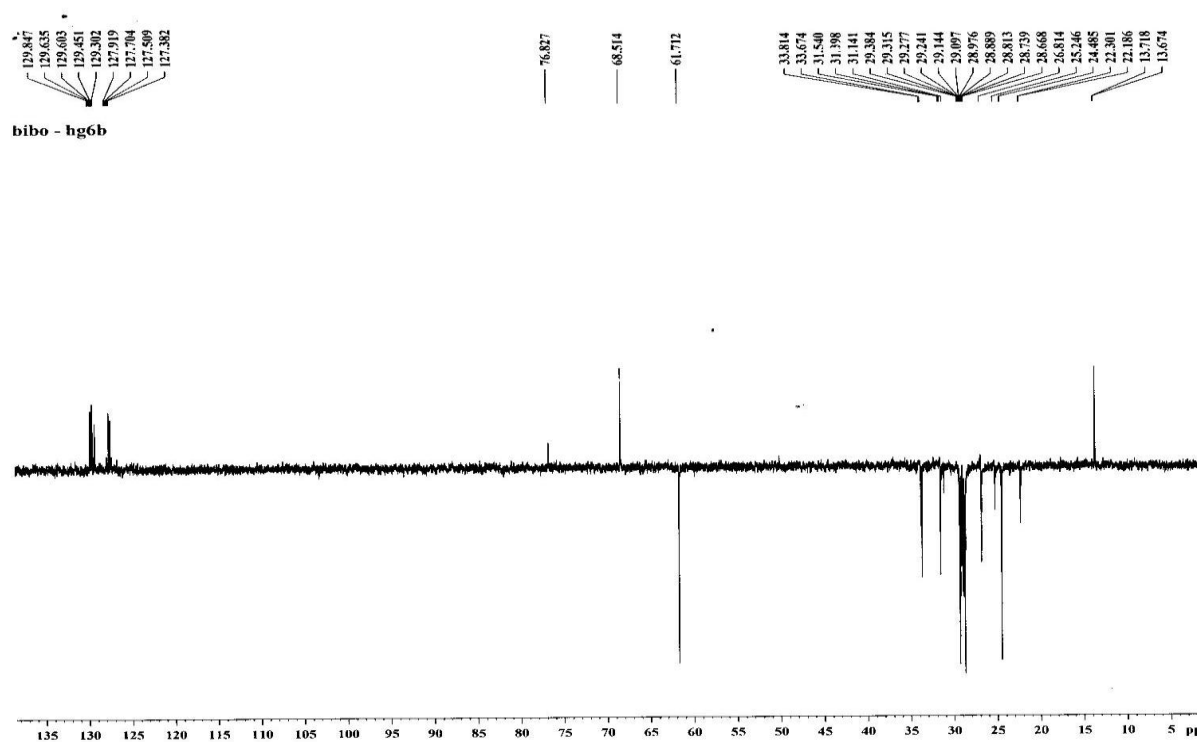


Figura 19: Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 400 MHz) da fração H6b, obtida por cromatografia em coluna de SREH.

Os sinais em δ_C 14,04 (CH_3), em δ_C 62,10 (O-CH_2 -), em δ_C 68,90 (CH-OH) e em δ_C 173,29 (C=O) permitiram propor para Hg6b a estrutura básica de um éster simétrico interligado por um sistema ($-\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2-$) (Figura 20).

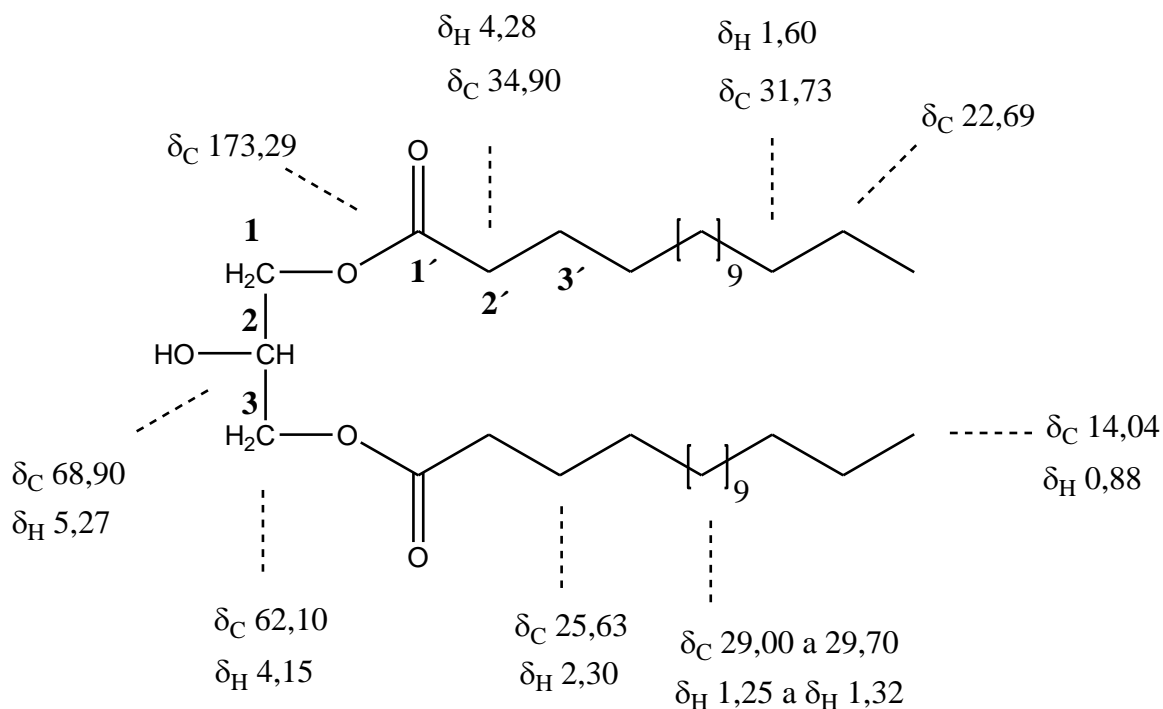


Figura 20: Estrutura proposta para Hg6b, com as atribuições de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Através da análise dos mapas de contornos HMQC (*Heteronuclear multiple quantum correlation*) e HMBC (*Heteronuclear multiple bond correlation*) e respectivas seções expandidas, confirmou-se as atribuições e correlações dos hidrogênios e carbonos de Hg6b. Observou-se correlação entre o sinal do carbono quaternário (C-1) em $\delta_{\text{C}} 173,20$ com o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 4,28$ ($\delta_{\text{C}} 34,90$) atribuído ao C-2. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos obtidos através da análise do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C foram compilados (Tabela 5).

Tabela 5: Atribuições de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para Hg6b

Carbono número	δ_{C}	δ_{H}
1 = 3	62,10	4,15
2	68,90	5,27
1' = 1''	173,29	-
2' = 2''	34,90	4,28
3' = 3''	25,63	3,30
4' = 4'' a 13' = 13''	29,00 a 29,70	1,25 a 1,32
14' = 14''	31,73	1,60
15' = 15''	22,69	-
16' = 16''	14,04	0,88

É interessante salientar que não foram encontrados na literatura, dados de RMN para 1,3-dípalmitoilglicerol, assim como esta foi a primeira vez que este composto foi isolado da polpa de *Syagrus romanzoffiana*.

O extrato etanólico da polpa dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (SREE) (Figura 7) apresentou-se como um material pastoso, denso, de cor amarelada e parcialmente solúvel em solventes orgânicos apolares. Por cromatografia em camada delgada de sílica gel foi verificado que se tratava de uma mistura complexa. Em função disso, optou-se nesse momento, por não efetuar tentativas de purificação desse material.

Por outro lado, o material sólido deste extrato (SREE-S), obtido durante a remoção parcial do etanol, após lavagem com acetato de etila, depois da secagem em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou faixa de fusão: de $181\text{-}185\text{ }^{\circ}\text{C}$, com decomposição, sendo muito solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos apolares. SRPEE-S foi submetido à cromatografia em camada delgada de silicagel, utilizando-se como eluente uma mistura de metanol-água (1:1) e vapores de iodo, como revelador. Por esse processo, foi possível observar apenas um constituinte nesse material sólido. Em função desse resultado e da estreita faixa de fusão, SRPEE-S foi submetido à espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e de ^{13}C).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos dept-135 e em duas dimensões HMQC e HSQC) foram obtidos em espectrômetro Bruker ADVANCE 200 (^1H : 200 MHz e ^{13}C : 50 MHz) utilizando D_2O como solvente e TMS como referência interna ($\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$).

No espectro de RMN de ^1H , foram observados sinais na região entre δ_{H} 3,32 e δ_{H} 4,66. O sinal em δ_{H} 5,27 (*d*, *J* 3,8 Hz) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico.

No espectro de RMN de ^{13}C foram detectados 13 sinais de carbono, sendo três deles atribuídos a carbonos metilênico δ_{C} 61,33 (C-6), δ_{C} 61,54 (C-1') e em δ_{C} 62,56 (C-6'), sete sinais atribuídos a carbono metínicos e um sinal de carbono quaternário em δ_{C} 104,92 (C-2'). De acordo com dados da literatura estes sinais de hidrogênio e de carbono são característicos de açúcares (BREITMEIER, 1989; AGRAWAL, 1992).

Açúcares desempenham um importante papel estrutural e funcional nas superfícies biológicas, atuando como receptores para uma variedade de hormônios e também participando dos processos de reconhecimento e diferenciação celular (TYRELL, 1986). A sacarose, um dos principais carboidratos encontrados em vegetais, é um dissacarídeo, não redutor, formado de glicose e frutose unidas por uma ligação α 1-2.

Em função deste fato, os espectros e dados espectrais obtidos para SRPEE-1 foram comparados com dados fornecidos pelo *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST) e disponibilizados através do *Spectral Database for Organic Compounds* (SDBS), (Anexo 01). Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para SREE-S, juntamente com os dados da AIST/SDBS, encontram-se listados na Tabela 6.

Tabela 6: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de SREE-S com dados da literatura

Carbono	δ_{C} Sacarose (AIST)*	δ_{C} SREE-S
C-1	93,20	93,41
C-2	72,14	72,31
C-3	73,68	73,82
C-4	70,41	70,47
C-5	73,44	73,63
C-6	61,24	61,39
C-1'	62,46	62,60
C-2'	104,71	104,92
C-3'	77,51	77,66
C-4'	75,09	75,25
C-5'	82,42	82,61
C-6'	63,44	63,62

* *Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)*. National Institute of Advanced Instrumental Science and Technology (AIST).

Através dessas análises foi possível deduzir que SREE-S tratava-se do dissacarídeo sacarose ou α -D-glicopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo (Figura 21).

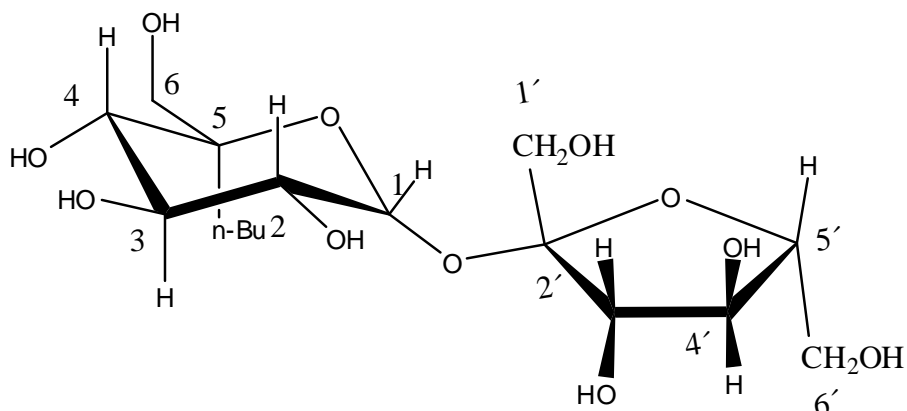


Figura 21: Estrutura química da sacarose (α -D-glicopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo).

É a primeira vez que esse açúcar foi identificado como sendo um constituinte de *S. romanzoffiana*.

5.2 – Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos extratos de *Syagrus romanzoffiana*

O reagente DPPH é um radical livre que produz coloração violeta em solução. Quando reage com uma substância antioxidante é reduzido e sua coloração passa de violeta a amarela. A leitura em 518 nm decresce a medida que o DPPH é reduzido. A utilização do DPPH é uma maneira rápida de se avaliar a atividade antioxidante de substâncias ou extratos vegetais.

Os extratos obtidos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*, tanto o hexânico (SREH), quanto o etanólico (SREE), foram avaliados em relação à sua capacidade de sequestrar radicais DPPH. Os resultados dos valores da redução do DPPH pelos extratos estão apresentados nas figuras 22 e 23, sendo que os valores de IC50 foram calculados por regressão linear.

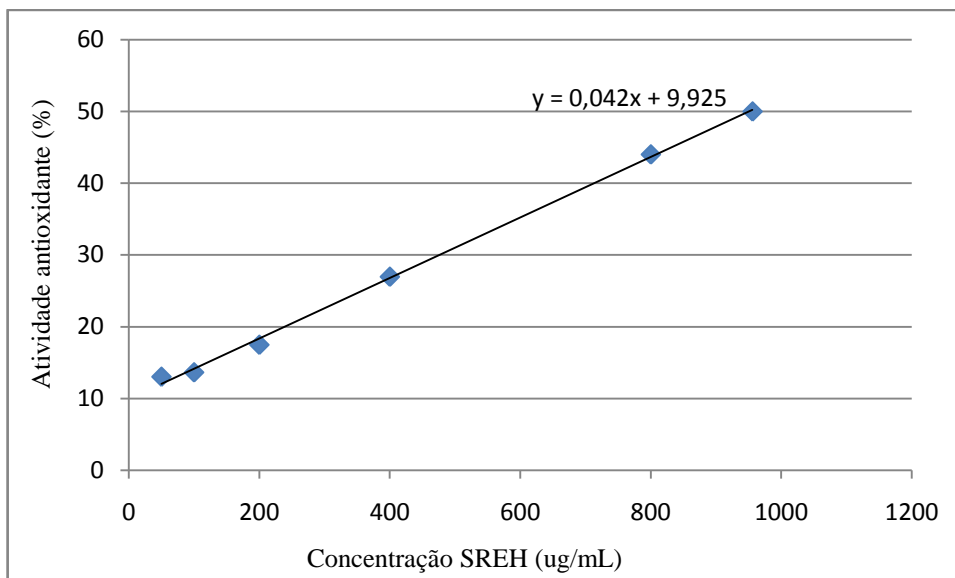


Figura 22: Regressão linear da atividade antioxidante do extrato hexânico da casca e polpa de *S. romanzoffiana* após 30 minutos.

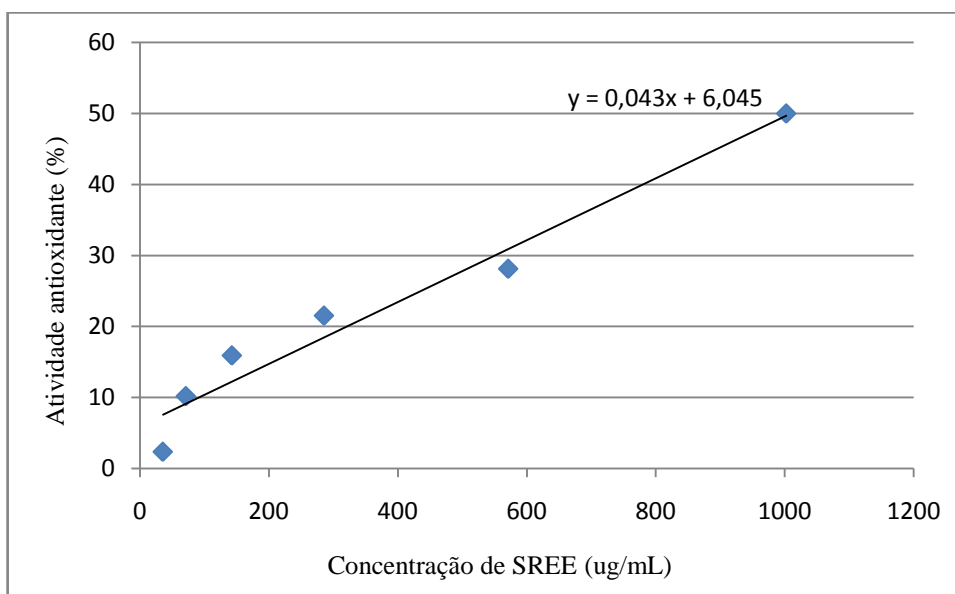


Figura 23: Regressão linear da atividade antioxidante do extrato etanólico da casca e da polpa de *S. romanzoffiana* após 30 minutos.

Decorridos 30 minutos de reação do extrato com a solução do radical DPPH, o extrato hexânico (SREH) apresentou IC-50 de 0,956 mg/ml, enquanto o extrato etanólico (SREE) apresentou IC-50 de 1,003 mg/ml.

5.3 – Determinação do EHL requerido para o óleo esqualano

O valor de EHL requerido para um determinado óleo pode ser determinado empiricamente, isto é, através do preparo de emulsões variando as porcentagens dos tensoativos de diferentes EHL e levando em consideração a solubilidade da cadeia lipídica dos tensoativos presentes na fase oleosa. Através deste processo obtém-se emulsões mais estáveis (BECHER, 2001; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Neste trabalho as emulsões foram obtidas variando-se as concentrações dos tensoativos Volpo N3 e Volpo N20, que apresentam valores de EHL de 6,6 e 15,5 respectivamente. As emulsões que apresentaram melhores características macroscópicas observadas após 24 horas de sua preparação foram as que apresentaram valores de EHL de 9,27 a 11,05. Essas emulsões foram escolhidas para continuidade dos estudos.

5.4 – Obtenção das nanoemulsões

O método de inversão de fases pela variação da fração volumétrica é um método eficiente na preparação de nanoemulsões, dependendo mais da razão entre a fase oleosa e emulsificante do que da fase aquosa propriamente (FERNANDEZ, 2004).

As formulações foram avaliadas de acordo com seus respectivos aspectos macroscópicos, quanto ao reflexo azulado, além de não apresentarem problemas de cremeação/separação de fases após 24 horas de preparo. Também foram avaliadas microscopicamente quanto à homogeneidade dos glóbulos. As formulações que apresentaram aspectos macroscópicos e microscópicos satisfatórios para continuidade dos estudos são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Constituição das formulações que apresentaram características macro e microscópicas satisfatórias

Formulação	Tensoativo lipofílico (%)	Tensoativo hidrofílico (%)	Fase oleosa (%)	Fase aquosa (%)
F1	5,0	5,0	10,0	80,0
F2	6,0	4,0	10,0	80,0
F3	3,5	1,5	10,0	85,0
F4	7,0	3,0	10,0	80,0

5.5 – Determinação da temperatura de inversão de fases

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

Os valores da condutividade elétrica das formulações F1, F2, F3, F4 são apresentados na figura 24.

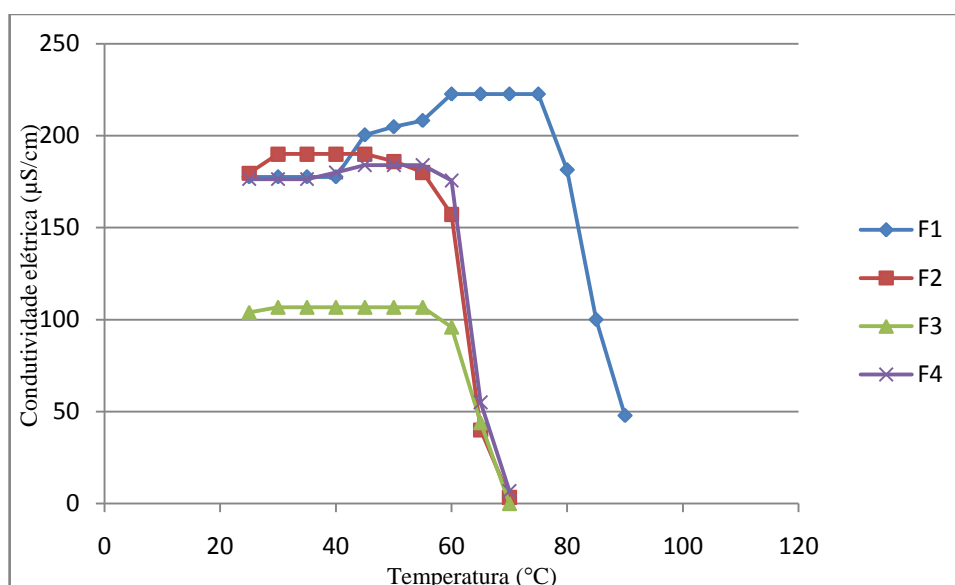


Figura 24: Valores da condutividade elétrica (µS/cm) pela temperatura (°C) das formulações F1, F2, F3 e F4.

Observou-se que a queda na condutividade elétrica da formulação F1, que apresenta uma maior concentração de tensoativo hidrofílico, ocorreu em temperatura maior que as demais formulações passando de 181,4 para 100,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ na faixa de temperatura de 80 a 85°C, como a temperatura de preparo das formulações foi de $75 \pm 2^\circ\text{C}$, para esta formulação não há possibilidade de ter ocorrido PIT, sendo que a inversão de fases por variação da fração volumétrica foi o único processo envolvido.

As formulações F2, F3 e F4 apresentaram queda de condutividade na faixa de temperatura de 60 a 65°C, sendo respectivamente de 157,2 para 40,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, de 96,0 para 44,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 175,6 para 55,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Essas três formulações apresentaram além de inversão de fases por variação da fração volumétrica o processo de inversão de fases pela temperatura.

A condutividade elétrica de F3, que apresenta em sua constituição 5% p/p de tensoativos, foi menor que as demais fórmulas que apresentam 10% p/p de tensoativos em sua constituição.

Devido ao fato de a constituição e a concentração da fase oleosa ser a mesma em todas as formulações, este parâmetro não teve influência na avaliação da temperatura de inversão de fases.

5.6 – Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos

As nanoemulsões foram manipuladas em diferentes velocidades de agitação, com o intuito de verificar a influência deste parâmetro, tanto no tamanho de glóbulos quanto na variação do índice de polidispersividade das formulações, tendo em vista que estes parâmetros são de extrema importância na avaliação da estabilidade das nanoemulsões.

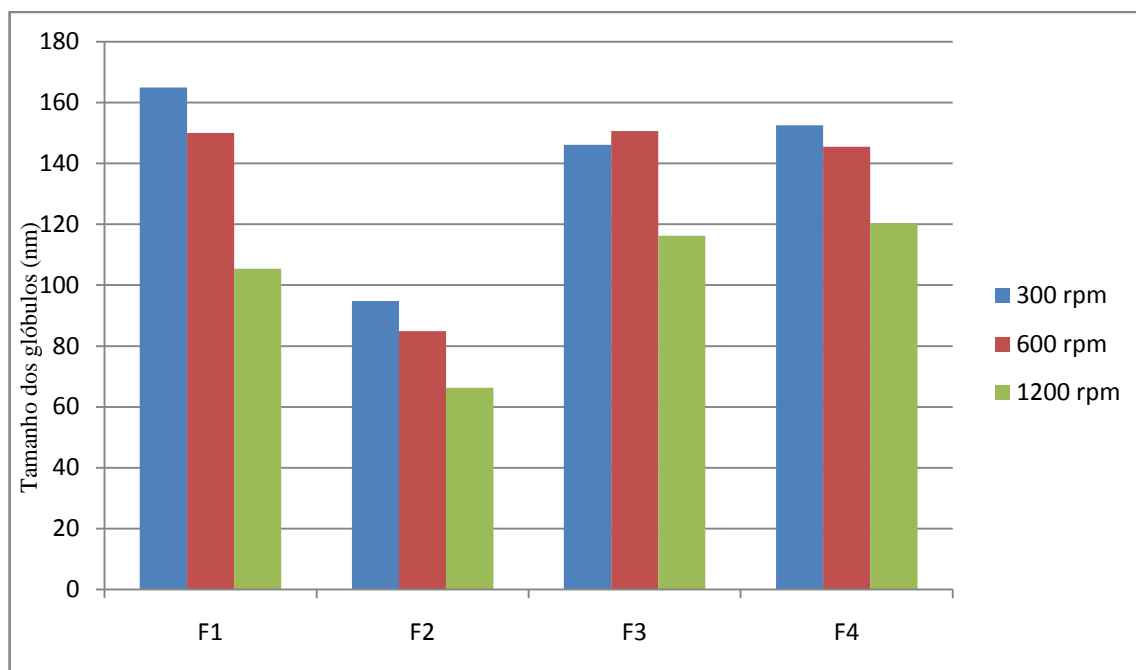


Figura 25: Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos.

Como podemos observar na figura 25 a velocidade de agitação teve considerável influência no tamanho dos glóbulos formados pelo método descrito, sendo que as formulações que tiveram uma maior velocidade apresentaram menor tamanho de partículas, devido à maior energia empregada no processo.

Não foi observado um aumento significativo nos valores do índice de polidispersividade das nanoemulsões avaliadas, o que é de grande importância na avaliação destas formulações, pois empregando uma maior velocidade têm-se partículas de tamanho reduzido, não alterando ainda sua estabilidade frente a este parâmetro.

Após essa avaliação, a velocidade de 1200 rpm foi escolhida para continuar os estudos das formulações.

5.7 – Determinação dos valores de pH

A determinação dos valores de pH é de grande importância em formulações tópicas, uma vez que estas devem estar de acordo com o pH natural da pele.

As formulações apresentaram pH levemente ácido, compatível com o pH da pele que apresenta valores de 4,1 a 5,8 (SEGGER et al., 2007).

Tabela 8: Determinação dos valores de pH das formulações antes e após o estresse térmico

Formulação	Valor do pH	Valor do pH após estresse
F1	4,34 ± 0,01	4,31 ± 0,01
F2	4,28 ± 0,02	4,23 ± 0,02
F3	4,73 ± 0,02	4,60 ± 0,01
F4	4,77 ± 0,02	4,68 ± 0,02
F1-H	4,10 ± 0,01	4,17 ± 0,01
F2-H	4,43 ± 0,03	4,40 ± 0,02
F3-H	4,53 ± 0,02	4,49 ± 0,01
F4-H	4,52 ± 0,01	4,47 ± 0,01
F1-E	4,08 ± 0,02	4,01 ± 0,01
F2-E	4,11 ± 0,01	4,10 ± 0,03
F3-E	4,02 ± 0,02	4,04 ± 0,02
F4-E	4,21 ± 0,01	4,18 ± 0,02
F2-AR	4,80 ± 0,05	4,81 ± 0,03
F3-AR	4,92 ± 0,06	4,89 ± 0,04

Formulações contendo: Extrato hexânico (H), extrato etanólico (E) e ácido retinóico (AR).

A determinação dos valores de pH das formulações antes e após o estresse térmico foi realizada e não observou-se modificações significativas destes valores, o que demonstra que os componentes das formulações não sofreram modificações que pudessem alterar o pH destas.

5.8 – Determinação da granulometria e dos valores de potencial zeta

A granulometria é um parâmetro importante na avaliação de sistemas

nanoemulsionados, devido ao fato de o tamanho das partículas ser o principal fator responsável pelo efeito promotor de permeação de componentes ativos nas camadas da pele.

Além do tamanho das partículas é fundamental conhecermos o índice de polidispersividade, uma vez que estes fatores somados exercem influência na estabilidade destes sistemas.

O valor do potencial zeta também é um parâmetro de avaliação da estabilidade e características das partículas, que nos indica a carga que esta apresenta na sua superfície, bem como a repulsão eletrostática existente entre elas.

Tabela 9: Granulometria e potencial zeta das nanoemulsões

Formulação	Após 24 horas		Após 7 dias		Potencial zeta
	Tamanho	IP	Tamanho	IP	
F1	124,2	0,478	126,8	0,606	-8,7 ± 0,6
F1-E	157,6	0,628	159,5	0,706	-10,7 ± 0,6
F1-H	158,1	0,527	158,6	0,631	-12,7 ± 0,7
F2	61,5	0,519	63,8	0,525	-10,8 ± 0,7
F2-E	66,7	0,682	67,5	0,655	-12,6 ± 0,2
F2-H	77,0	0,560	77,3	0,665	-13,9 ± 0,5
F3	112,9	0,234	117,5	0,345	-6,9 ± 0,4
F3-E	133,6	0,473	134,2	0,584	-12,6 ± 0,6
F3-H	122,3	0,333	132,0	0,458	-13,3 ± 0,7
F4	152,5	0,608	165,2	0,689	-8,7 ± 0,6
F4-E	170,7	0,789	172,4	0,863	-8,4 ± 0,8
F4-H	178,8	0,806	180,4	0,832	-7,1 ± 0,6
F2-AR	75,3	0,532	77,5	0,556	-8,5 ± 3,3
F3-AR	120,8	0,389	123,5	0,408	-11,9 ± 0,7

Formulações contendo: Extrato hexânico (H), extrato etanólico (E) e ácido retinóico (AR).

Observando a tabela 9 notamos que as formulações representadas por F2, apresentaram partículas muito menores que as demais formulações, ao passo que as

formulações F3 foram as que apresentaram um menor índice de polidispersividade.

As formulações que continham os extratos tanto etanólico como hexânico apresentaram um leve aumento no tamanho dos glóbulos, quando comparados as formulações de mesmo EHL que apresentavam apenas o óleo de esqualano em suas constituições.

Em sua maioria as formulações não apresentaram grande variação de tamanho e IP decorridos 7 dias de seu preparo, sendo que as formulações que apresentavam apenas o esqualano em sua constituição tiveram um IP inferiores a 0,7.

Em relação ao potencial zeta, não foi observado valores considerados suficientes para que tivesse um grande efeito de estabilização eletrostática dos glóbulos, o que já era esperado, devido ao fato de os tensoativos empregados serem não iônicos. Observou-se um leve aumento, em módulo, de seus valores naquelas formulações que apresentavam os extratos de *Syagrus romanzoffiana*, exceto nas formulações F4, onde não foi observado mudança em seus valores.

5.9 – Avaliação da estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar de uma emulsão tem como finalidade auxiliar a triagem das formulações desenvolvidas.

As nanoemulsões foram avaliadas microscopicamente em relação a sua homogeneidade, e quanto à existência de regiões de anisotropia, que indicariam presença de cristais líquidos nas formulações.

As nanoemulsões se mostraram homogêneas, não houve a formação de regiões de anisotropia, logo não foi possível observar a presença de cristais líquidos.

O teste de centrifugação aumenta os efeitos da força de gravidade sobre os glóbulos dispersos nas nanoemulsões, aumentando conseqüentemente o número de colisões entre eles, ocasionando fenômenos de instabilidade no sistema como cremeação e sedimentação, permitindo a visualização destes processos na dispersão (BECHER, 1965).

Em nanoemulsões a força da gravidade é superada pelo efeito browniano das partículas, dificilmente provocando relevantes efeitos de instabilidade no sistema (FORGIARINI et al., 2001; TADROS et al., 2004). Contudo em formulações que apresentam alto índice de polidispersividade a centrifugação acelera o processo de cremeação, uma vez que as partículas maiores tendem a migrar para a superfície.

Assim o efeito da gravidade a longo prazo sobre as formulações pode ser estimado utilizando velocidades de centrifugação moderada.

O teste de estresse térmico permite o aumento da energia cinética no sistema, possibilitando avaliar a estabilidade da nanoemulsão.

Os resultados de centrifugação e estresse térmico estão listados na tabela 10.

Tabela 10: Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico

Formulação	Centrifugação	Estresse Térmico								
		40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°
F1	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F4	N	N	N	N	N	CL	CL	SF	SF	SF
F1-H	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2-H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F3-H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F4-H	N	N	N	N	N	CL	CL	SF	SF	SF
F1-E	CL	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F2-E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F3-E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F4-E	N	N	N	N	N	CL	CL	SF	SF	SF
F2-AR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
F3-AR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: N: Normal, CL: Cremeação leve, CI: Cremeação intensa, SF: Separação de fases.

Dentre as formulações testadas, as nanoemulsões que apresentaram sinais de instabilidade após o teste de centrifugação foram as que apresentavam maior valor de EHL e maior tamanho de glóbulos (Tabela 10). Provavelmente isso ocorreu, em função do filme interfacial formado não ter sido tão bem estruturado ao ponto de evitar este tipo de instabilidade.

No estresse térmico as formulações que apresentavam valores de EHL de 9,27 contendo 10% de tensoativos apresentaram instabilidade em temperaturas elevadas, chegando a ocorrer separação de fases nestas formulações. No entanto a desestabilização do sistema em

temperaturas elevadas não significa que estas emulsões não sejam estáveis à temperatura ambiente.

5.10 – Comportamento reológico das formulações

O comportamento reológico das formulações foi avaliado utilizando a Lei das Potências, dada pela fórmula:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

Onde:

- τ - tensão de cisalhamento;
- k - o índice de consistência;
- $\dot{\gamma}$ - taxa de cisalhamento;
- n - é o índice de fluxo.

Tabela 11: Comportamento reológico das formulações

Formulação	Índice de fluxo	Índice de consistência	Viscosidade aparente(cP)
F1	0,37	1147	9,72
F2	0,31	1274	7,21
F3	0,49	238,4	5,34
F4	0,42	615,3	9,67
F1-H	0,38	501,4	5,68
F2-H	0,20	3663	9,26
F3-H	0,32	903,4	5,51
F4-H	0,44	677,1	10,92
F1-E	0,31	1426	8,14
F2-E	0,33	1187	7,74
F3-E	0,36	760,8	6,37
F4-E	0,39	1400	10,46
F2-AR	0,70	43	4,49
F3-AR	0,68	46,2	4,22

Observando a tabela 11, notamos que todas as formulações apresentaram índice de

fluxo $n < 1$, o que significa que apresentam comportamento pseudoplástico, logo quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas partículas tendem a se orientar na direção da força aplicada e quanto maior esta força, conseqüentemente, menor será a sua viscosidade aparente.

As formulações apresentaram baixa viscosidade aparente, o que já era esperado devido ao tamanho reduzido das partículas das nanoemulsões, sendo as formulações F3 que possuíam menor porcentagem de tensoativo as que apresentaram viscosidades mais baixas.

As nanoemulsões contendo ácido retinóico em sua constituição apresentaram os menores valores de viscosidade aparente.

5.11 – Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Linearidade da curva analítica

A curva construída para a avaliação da linearidade do método analítico apresentou coeficiente de correlação linear satisfatório ($r = 0,99931$, figura 26) após análise por regressão linear dos pontos analisados. Este resultado está em conformidade com o especificado pela resolução RE 899 (BRASIL, 2003).

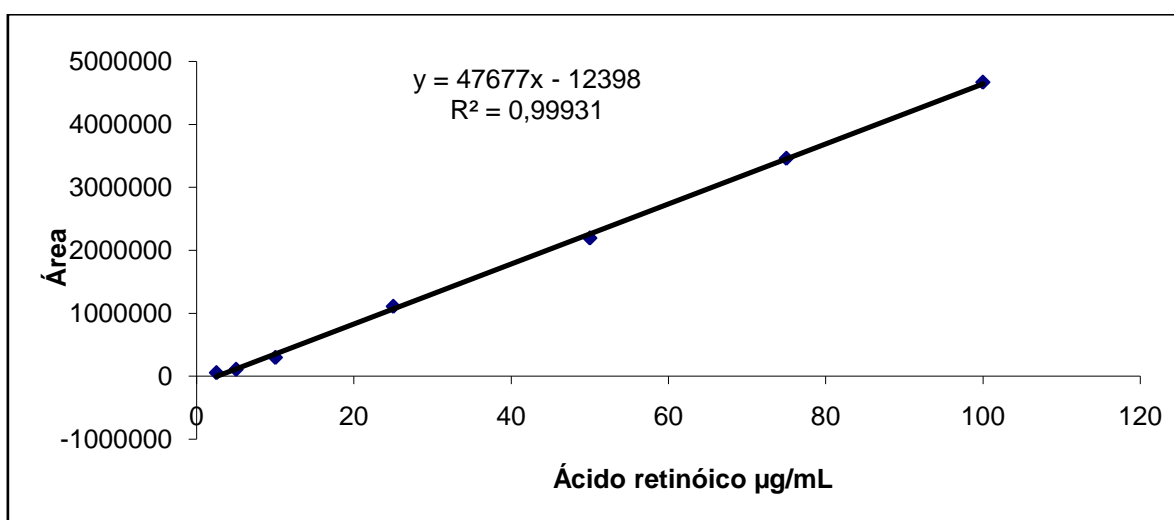


Figura 26: Curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação do ácido retinóico (AR) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A equação da reta obtida da análise de regressão linear foi: $y = 47677x - 12398$, e o tempo de retenção médio encontrado foi de 5,8 minutos (figura 26).

Determinação da seletividade do método analítico

Através da análise do ácido retinóico por CLAE obteve-se um cromatograma contendo dois sinais com tempo de retenção menor do que o do ácido retinóico, que apresentaram área sob o pico, menores do que a do AR (Figura 27).

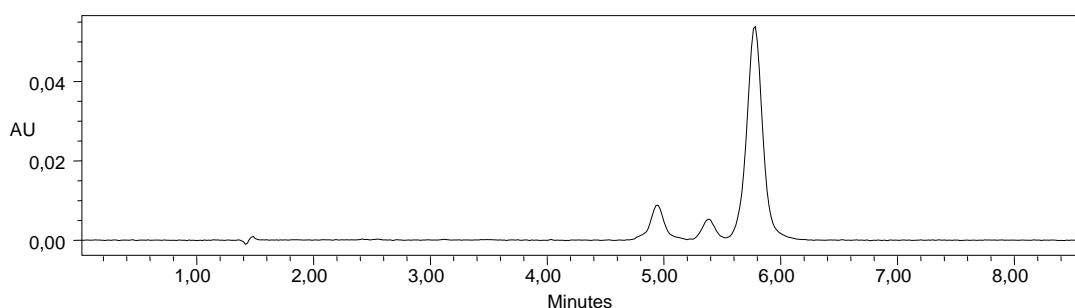


Figura 27: Cromatograma do ácido retinóico grau farmacêutico, obtido por CLAE.

Determinação da precisão do método analítico

A precisão de um método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, indicando o desvio padrão relativo devido ao acaso. Foram avaliados as precisões intra-corridas e inter-corridas. Esse resultado está de acordo com a RE 899 (Brasil, 2003), que especifica a um DPR máximo de 5% na análise do parâmetro precisão. O método analítico desenvolvido neste trabalho apresentou precisão satisfatória.

5.12 – Estudo de liberação *in vitro* do ácido retinóico

A célula de difusão tipo Franz permite a análise *in vitro* do movimento do fármaco através de uma membrana, utilizando um modelo com dois compartimentos. O compartimento doador contém a formulação, e uma membrana semipermeável que separa este compartimento da solução receptora, e que suporta o sistema de liberação (REMINGTON, 2006).

Para o estudo de liberação *in vitro* foram avaliadas duas formulações de nanoemulsões desenvolvidas neste estudo, uma formulação creme comercial e solução de ácido retinóico. Para cada uma das nanoemulsões, foi traçado um perfil de liberação de ácido retinóico em células do tipo Franz, utilizando membranas de nylon (Figura 28).

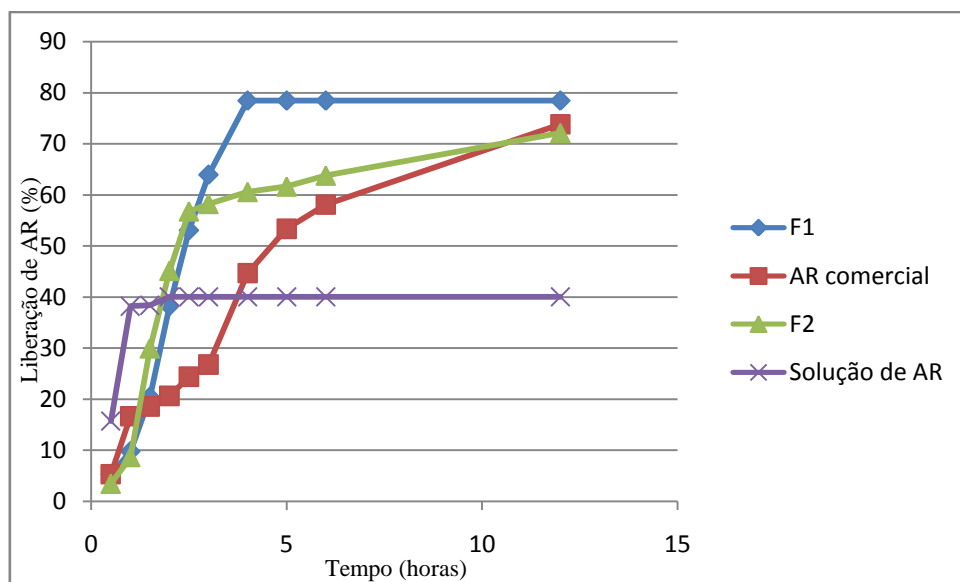


Figura 28: Perfil de liberação de ácido retinóico obtido através de células do tipo Franz, utilizando membranas de nylon.

Observou-se que todas as formulações apresentaram liberação máxima 12 horas após a aplicação da amostra nas células. As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram liberação mais rápida do que a formulação comercial. Em duas horas e 30 minutos as nanoemulsões liberaram mais de 50% do AR. No mesmo tempo a formulação comercial liberou menos da metade deste conteúdo (Figura 28).

A velocidade de dissolução do fármaco a partir de um sistema é influenciada pelo tamanho da partícula. A velocidade aumenta quando o tamanho da partícula diminui, devido ao aumento da área de superfície das partículas contendo fármaco (ZILI et al., 2005).

Após quatro horas e meia, a formulação F1 alcançou liberação máxima de 78 %, após 12 horas a formulação F2 alcançou liberação máxima de 72 %, e o ácido retinóico comercial alcançou liberação máxima, de 73 %, também após 12 horas.

O estudo foi considerado satisfatório, pois a membrana permitiu a passagem do ácido retinóico independente do veículo utilizado. A temperatura de 37 °C foi relevante uma vez que nesta temperatura o creme apresentou uma menor viscosidade, diminuindo assim a

interferência deste parâmetro. O meio receptor foi álcool etílico e não apresentou saturação do meio.

A quantidade de AR no meio receptor alcançou a liberação de 78%, isso se deve as perdas de substância, nas paredes do local de aplicação da célula de Franz e principalmente pela difusão do ácido retinóico através da membrana de nylon.

Através dos resultados obtidos neste experimento verificou-se que a encapsulação do AR em nanoemulsões aumentou a difusão do fármaco lipofílico, quando comparado com a formulação comercial e com a solução alcoólica de AR.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados e dos resultados obtidos podemos chegar a algumas conclusões, tanto na análise dos extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*, quanto das nanoemulsões desenvolvidas contendo estes extratos, além da avaliação dos processos utilizados nesta pesquisa.

Os processos cromatográficos de separação das substâncias dos extratos avaliados se mostraram eficazes no isolamento dos constituintes, uma vez que foi possível a identificação de alguns compostos através da análise fitoquímica das frações destes extratos.

A análise fitoquímica do extrato hexânico nos possibilitou identificar uma das substâncias que a compõem, observamos a identificação do 1,3 – dipalmitoil glicerol, tendo em vista que não foi encontrado na literatura dados de RMN para este composto, esta pesquisa foi de grande importância para o conhecimento do comportamento desta substância, sendo importante salientar que esta foi a primeira vez que o 1,3 – dipalmitoil glicerol foi isolado e identificado em frutos de *Syagrus romanzoffiana*. Estudos mais aprofundados desta substância se fazem necessários, uma vez que pode haver aplicações para a indústria cosmética.

A análise do extrato etanólico nos permitiu a identificação da sacarose, que se trata de um dos principais açúcares encontrados nos extratos vegetais.

Estes resultados foram de relevância para este estudo, uma vez que estas substâncias não haviam sido identificadas para os frutos das palmeiras de *Syagrus romanzoffiana*.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* utilizando o reagente DPPH, nos permitiu avaliar a concentração destes extratos que causa 50% de inibição do processo de oxidação envolvido. Os extratos apresentaram boa atividade antioxidante, sendo esta etapa de suma importância para a determinação da concentração destes extratos a ser utilizada nas nanoemulsões desenvolvidas.

O método de inversão de fases foi eficiente na preparação das nanoemulsões, este método apresenta grande vantagem por se tratar de um método que envolve baixa energia de emulsificação, sendo um processo mais simples e barato, sendo mais atrativo, tanto para o estudo em bancada, quanto para a produção em escala industrial.

Na caracterização das formulações obtivemos nanoemulsões com granulometria adequada, sendo que a adição dos extratos de *Syagrus romanzoffiana* não alterou as características obtidas no desenvolvimento destas, vale salientar que este foi o primeiro estudo

envolvendo o desenvolvimento de nanoemulsões contendo estes extratos e que mais estudos devem ser conduzidos para uma melhor compreensão de outras atividades farmacológicas envolvidas na utilização destas formulações.

A avaliação das características físico-químicas das nanoemulsões demonstraram que estas formulações foram estáveis nas condições avaliadas, logo estas nanoemulsões se mostraram promissoras no desenvolvimento de produtos fitocosméticos nanoemulsionados, havendo a necessidade de mais estudos para que estas possam vir a ser lançadas no mercado.

No teste de liberação *in vitro* do ácido retinóico utilizando modelo de células do tipo Franz e membrana de nylon demonstrou que estas nanoemulsões foram capazes de aumentar a velocidade de liberação deste ativo, quando comparados a produtos convencionais como as emulsões simples, sendo este tipo de formulação uma ferramenta de grande importância para melhorar a liberação de ativos pela via tópica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides **Phytochemistry** 1992, *31*, 3307.

ALMEIDA, M.E.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27(5), p.280-288, 2008.

ALVES-COSTA, C. P. Efeitos da defaunação de mamíferos herbívoros na comunidade vegetal. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.107, 2004.

ARCHONDO A.E.D.L. **Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo extrato de *Centella asiática* L. (Urban)**. [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

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

BECHER, P.; SCHICK, M. J. Macroemulsions. **Nonionic Surfactants: physical chemistry**, M. J. Schick. Marcel Dekker, New York; p.435–481, 1987.

BINKS, B. P.; CLINT, J. H.; FLETCHER, P. D. I.; RIPPON, S. **Kinetics of Swelling of Oil-in-Water Emulsions**. *Langmuir*, v.14, p.5402-5411. 1998.

BOVERIS A, CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.**; v.134: p.707–716, 1973.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR spectroscopy – High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**, 3rd ed., VCH: Weinheim, 1989.

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.

BROOKS, D. M. 2003. The role of size assortment in structuring Neotropical bird communities. **Tex. J. Sci.** 55: 59–74.

BUCK, P. Skin barrier function: Effect of age, race and inflammatory disease. **International Journal of Aromatherapy**, v.14, p.70-76, 2004.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, v.14 (2): p.54-57. 2002.

CAPEK, I. Sterically and electrosterically stabilized emulsion polymerization: Kinetics and preparation. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.99, p. 77-162, 2002.

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

CHORILLI M., LEONARDI G. R.; SALGADO H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.**, v.88(3), p. 113-118, 2007.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin Dermatol**, v.13, p.375-380, 1995.

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

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*

2000;408:239–47.

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

GLASSMAN, S.F. 1987. Revision of the palm genus *Syagrus* Mart. and the other genera in the *Cocos* Alliance. **Illinois Biological Monographs** 56: 1-231.

GORDON M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Nat Prod Rep.**; v.13, p.265–273, 1996.

GUIX, J. C. & RUIZ, X. Plant-disperser-pest evolutionary triads: how widespread are they. **Orsis**, v.15, p. 121-126, 2000.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th.ed. New York: **Oxford Science Publications**, p.936. 2000.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G. OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29(1), p.81-96, 2008.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J. ;TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the PIT method, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.285, p.388-394, 2004.

JOHNSON IT. Antioxidants and antitumour properties. In: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. **Antioxidants in food**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. p. 100–123, 2001.

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

LODÉN, M. Do moisturizers work?. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 2, n. 3-4, p. 141-149, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum. 1992.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C. & BEHR, N. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, Plantarum. 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4ª ed., Vol. 1, Instituto Plantarum, Nova Odessa, p.368, 2002.

LORENZI, H. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, p.160, 2004.

MADISON, K.C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’EOE tre” of the Epidermis. **J Invest Dermatol**, v.121, p.231-241, 2003.

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

NOBLICK, L.R. *Syagrus*. **The Palm Journal**. v.126: p.12-46, 1996.

OLMOS, F.; R. PARDINI; BOULHOUSA, R.L.P.; BÜRGI R. & C. MORSELLO. Do tapirs steal food from palm seed predators or give them a lift? **Biotropica**, v. 31, p. 375-379, 1999.

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.

PAYS, K.; MABILLE, C.; SCHMITT, V.; LEAL-CALDERON, F.; BIBETTE, J. Understanding the Stability and Lifetime of Emulsions. **J. Dispersion Science and**

Technology, v.23(1–3), p.175–186, 2002.

PROKSCH E.; LACHAPELLE J.M. The management of dry skin with topical emollients—recent perspectives. **J. Dtsch Dermatol Ges.**, v.10, p.768-74, 2005.

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

SALAGER, J.L.; FORGIARINI, A.; MARQUÉZ, L.; PENA, A.A. PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M. P.; GONZALES, M. R. Using emulsion inversion in industrial processes **Adv. Colloid Interface Sci.**, 108-109, 259-272, 2004.

SILVERSTEIN, G.C. BASSLER, T.C. MORILL, E.L, Identification Spectrométrique de Composés organiques, in: De Boeck (Ed.), Paris, 1998.

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

SONG, M.G.; JHO, S.H.; KIM, J.Y.; KIM, J.D. Rapid Evaluation of Water-in-Oil (w/o) Emulsion Stability by Turbidity Ratio Measurements. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.230, p. 213–215, 2000.

SONNEVILLE-AUBRUN, 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.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

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

TYRELL P. M. AND PRESTEGARD J. H. Structural Studies of Carbohydrates by Deuterium NMR: Sucrose. **J. Am. Chem. Soc.** 1986, *108*, 3990-3995.

USÓN, 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: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.250, p.415-421, 2004.

VELLOSO, F.T.; FERRAZ, R.S.; LIRA, A.A.M; SANTANA, D.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45(1), p.177-183, 2009.

WERTZ, P.P. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Derm Venereol**, Supp 208, p.7-11, 2000.

WILLCOX J.K.; ASH S.L.; CATIGNANI G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.44, p.275-295, 2004.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campus, p.151. 1995.

ZATZ, J.L. Scratching the surface: rationale and approaches to skin permeation. In: J.L. Zatz, Editor, **Skin Permeation-Fundamentals and Application**, Allured, Wheaton, p.11-31, 1993.

ANEXOS

8 – ANEXOS

Anexo 01:
Espectros e dados espectrais de RMN da sacarose,
disponibilizados pelo SDBS

Spectral Database for Organic Compounds (SDBS), organizado pelo *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*, Japão.

Sítio eletrônico: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng

Acessado em 20 de Agosto de 2010.

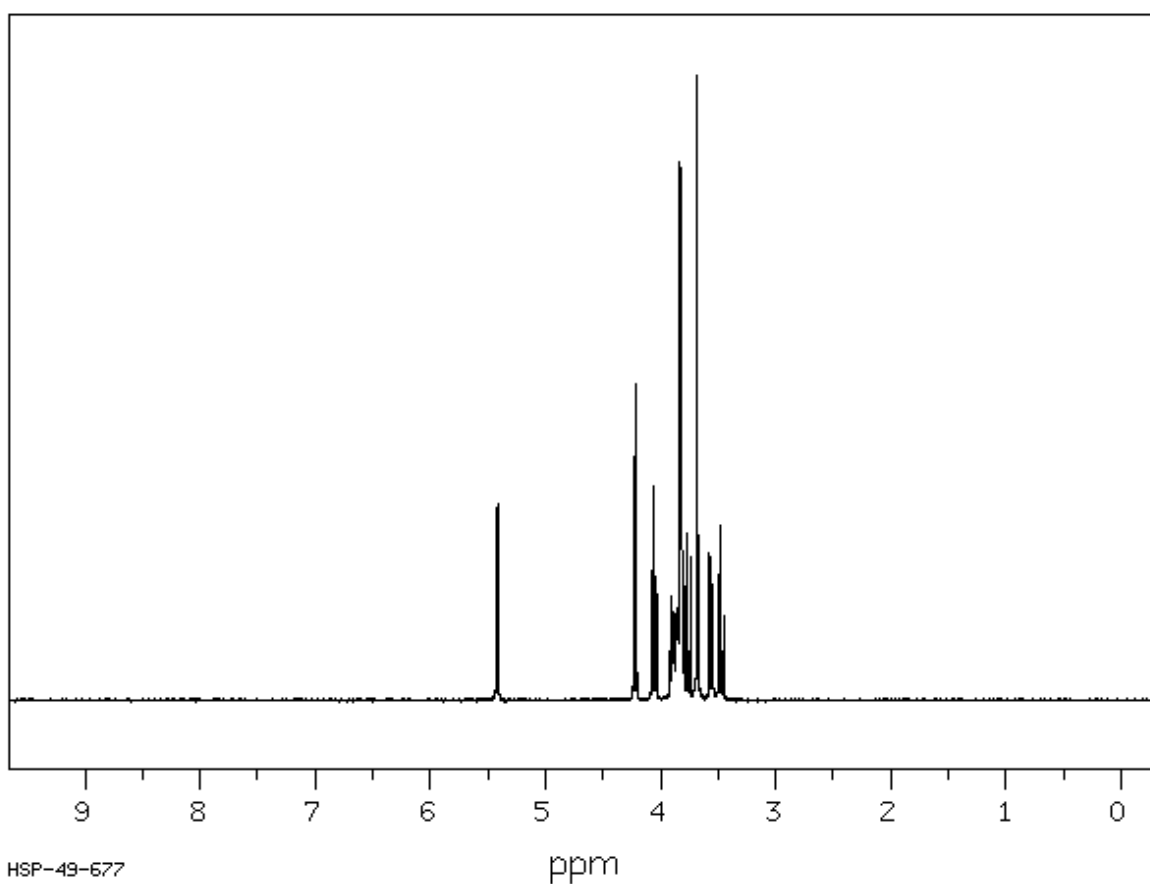
SDBS-¹H NMRSDBS No. 1188HSP-49-677

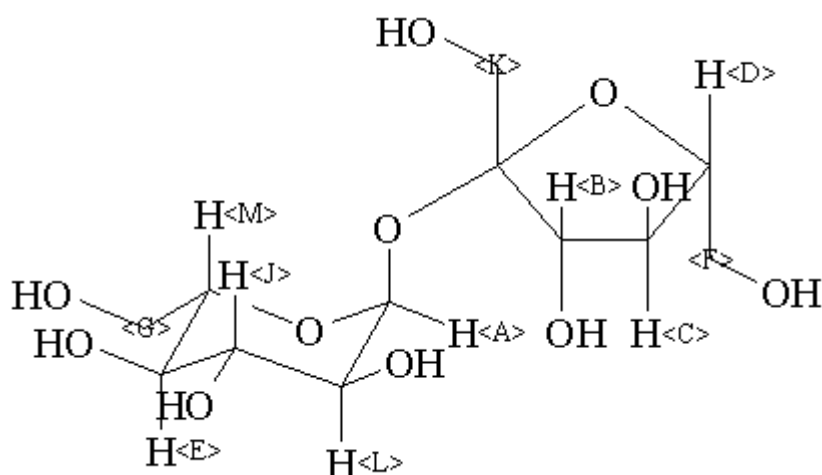
399.65 MHz

C₁₂ H₂₂ O₁₁

0.038 g : 0.5 ml D₂O

D-(+)-sucrose





Assign.	Shift (ppm)
A	5.418
B	4.219
C	4.055
D	3.89
E	3.86
F	3.826
G	3.817
J	3.762
K	3.679
L	3.563
M	3.476

ASSIGNED BY H-H AND C-H COSY.
THE SOLVENT SIGNAL SUPPRESSED.

peak data

SDBS No. 1188HSP-49-677

[\(c\) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology \(AIST\)](#)

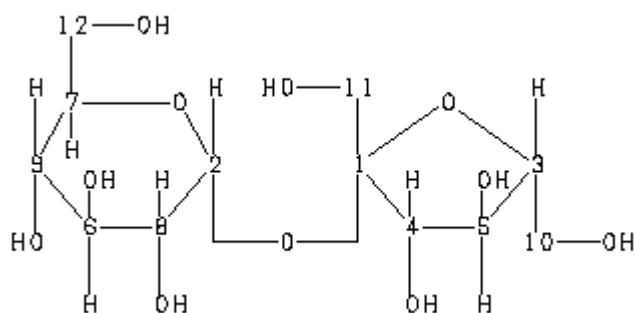
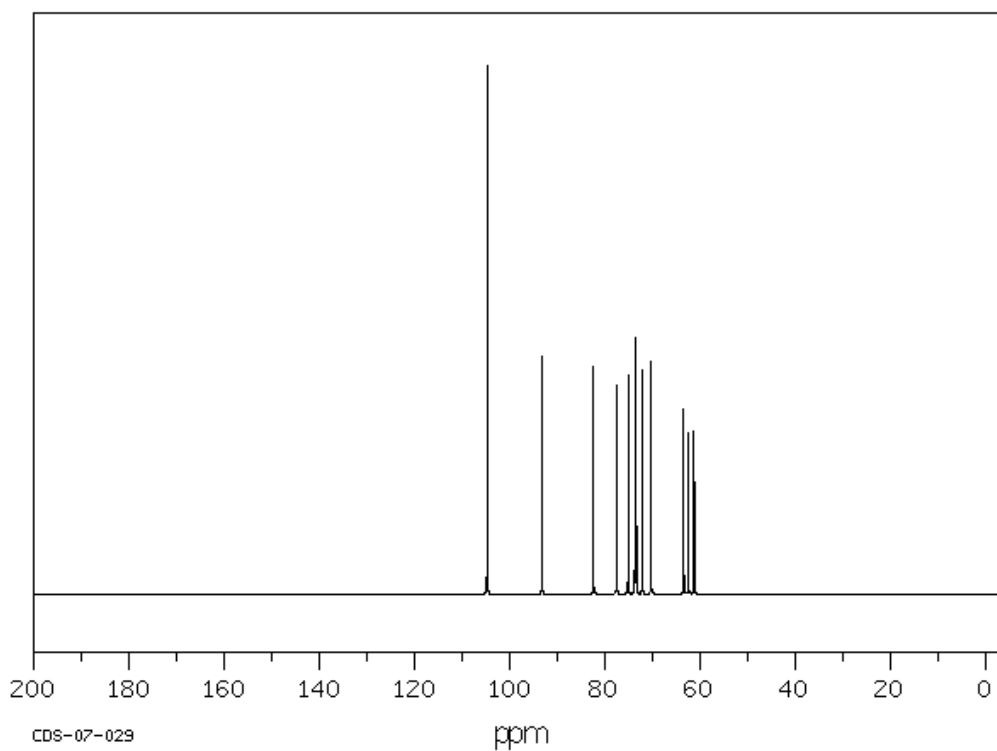
SDBS-¹³C NMR SDBS No. 1188CDS-07-029

C₁₂ H₂₂ O₁₁

D-(+)-sucrose

25.16 MHz

0.58 g : 2 ml D₂O



ppm	Int.	Assign.
104.71	1000	1
93.20	448	2
82.42	428	3
77.51	393	4
75.09	413	5
73.68	433	6
73.44	483	7
72.14	423	8
70.31	438	9
63.44	348	10
62.46	303	11
61.24	308	12

ASSIGNED BY C-H COSY.

SDBS No. 1188CDS-07-029