



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO  
ÓLEO EM ÁGUA A PARTIR DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe  
oleracea* M.)**

**Denise Maria Loureiro Contente**

BELÉM - PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO  
ÓLEO EM ÁGUA A PARTIR DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe  
oleracea* M.)**

**Autor: Denise Maria Loureiro Contente  
Orientadora: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Contente, Denise Maria Loureiro, 1969-  
Obtenção e caracterização de nanoemulsão óleo em  
água a partir de óleo de açaí (euterpe oleracea m.) /  
Denise Maria Loureiro Contente. - 2016.

Orientador: José Otávio Carréra Silva  
Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Óleos vegetais. 2. Euterpe oleracea M..  
3. Nanotecnologia. 4. Cetoconazol. I. Título.

CDD 22. ed. 615.321

---

**Denise Maria Loureiro Contente**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA A  
PARTIR DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Maria Ribeiro Costa  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima  
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

BELÉM – PA

2016

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me orientado nos momentos mais difíceis e por ter colocado pessoas maravilhosas nesta jornada, que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais, Pedro e Maria, pela compreensão, dedicação e sacrifícios, que culminaram em todas as conquistas da minha vida. Aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho.

Ao meu querido marido Luis Carlos, pelo incentivo na minha parte profissional e pelo amor e carinho na nossa batalha diária.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior, pela orientação concedida, apoio e confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, respeito, compreensão e paciência.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Roseane Maria Ribeiro Costa, pela gentileza, apoio, confiança e pela disponibilização do Laboratório de Controle de Qualidade e Nanofarm.

Ao Prof Dr<sup>o</sup> Antonio Manoel da Cruz pelo apoio e disponibilidade durante a execução da cromatografia gasosa.

Ao Prof Carlos Emmerson e José Roberto Zamian pela disponibilização do Laboratório de Oleoquímica da UFPA.

Ao Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz pelo apoio disponibilizando o laboratório do Instituto Evandro Chagas para o preparo das amostras para uso no MET.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edilene Oliveira por seu empenho para realização da análise morfológica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rossiane Vommaro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas imagens das amostras por MET.

À professora Jaqueline Rodrigues pelo apoio e amizade durante sua estadia como professora visitante na UFPA.

Aos meus queridos amigos do Laboratório P&D Medicamento e Cosmético, Luan, Russany, Diego, Fernanda, Natália e Ana Paula pela amizade e apoio. E em especial à Rayanne Rocha Pereira, por ser uma pessoa incrível, sempre disposta a ajudar.

Aos colegas que ingressaram junto comigo no mestrado, pela troca de experiências, em especial ao Maria Adriana Ribeiro, Rosana Monteiro e Valdicley.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA, Brasília e Cliciane, pelo apoio e paciência.

Ao professor Dr. José Luiz Vieira, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos do Laboratório de Controle de Qualidade, especialmente a Taylon, Ana, Lorena, Saulo e Kallene pelo apoio, carinho e amizade.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À SESPA por ter me apoiado na realização deste trabalho.

Aos amigos do trabalho Izameire Moraes Corrêa, Nair Freitas Castro, Luciana Melo, Ana Lucia do Nascimento Moraes, Walquíria, Rosemar, Claudineia dos Anjos pelo apoio e contribuição na realização deste trabalho.

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus profundos agradecimentos.

## RESUMO

**CONTENTE, D. M. L. Obtenção e Caracterização de Nanoemulsão Óleo em Água a partir de Óleo de Açaí. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, p. 92 Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.**

Nanoemulsões têm sido propostas como uma opção de sistemas de liberação de fármacos de atual e crescente interesse, devido a uma série de vantagens quando comparadas a formulações tradicionais. Os óleos vegetais são considerados insumos farmacêuticos de grande valor como matriz lipídica desses sistemas, como o óleo de açaí, óleo de origem amazônica, que possui uma série de benefícios medicinais, como atividade antioxidante e hidratante, além de biocompatibilidade, aumenta a elasticidade da pele e atua como barreira física. O objetivo do presente trabalho foi obter nanoemulsão O/A, a partir de óleo de açaí, tensoativo e água, por meio do método de temperatura de inversão de fase, para uso tópico. O óleo de açaí foi caracterizado por ensaios físico-químicos, bem como quanto ao perfil de ácidos graxos por Cromatografia gasosa (CG), espectrometria na região do infravermelho (FT-IR) e análise térmica por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). O tensoativo, o cetoconazol e suas misturas binárias com o óleo de açaí foram avaliados por DSC. Obteve-se nanoemulsões fazendo uso do óleo de açaí, Brij<sup>TM</sup> CS20, água e o cetoconazol. A caracterização das nanoemulsões foi realizada quanto ao tamanho das gotículas, índice de polidispersidade (IP), potencial zeta (PZ), morfologia e eficiência de encapsulação (EE). O óleo de açaí apresentou índice de acidez (3,78 mg KOH/g), índice de iodo (71 gl<sup>2</sup>/100g), índice de saponificação (199 mg KOH/g), índice de refração (1,470) e densidade (0,950g/ml). Na análise por CG apresentou 68,05% de ácidos graxos insaturados, sendo 47,58% de ácido oleico. A estabilidade oxidativa do óleo de açaí em Rancimat foi cerca de 11,79 horas. A análise espectrométrica FT-IR confirmou bandas sugestivas dos ácidos graxos insaturados e por análises térmicas observou-se que a degradação térmica ocorre acima de 200°C. As combinações das matérias-primas analisadas por DSC foi possível observar que a incorporação do cetoconazol com o óleo de açaí. A nanoemulsão B10 com cetoconazol a 0,5 % apresentou 98,31 % de EE. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou gotículas com formato esférico e após estudo de PZ (-25,53 mV ± 10,04), IP (0,37 ± 0,04) e tamanho (128,53 nm ± 10,04) por 30 dias, a nanoemulsão apresentou pouca variação. Assim, pode-se afirmar que o óleo de açaí tem potencial para ser empregado como insumo farmacêutico podendo ser usado como fase oleosa de nanoemulsões carreadoras de substâncias lipossolúveis.

**Palavras-chave:** Cetoconazol; Nanoemulsão; Óleo de açaí; Temperatura de inversão de fase.

## ABSTRACT

**CONTENTE, D. M. L. Obtaining and characterization of nanoemulsion Oil in Water from açai oil. Dissertation (Master's Degree) – Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, 92 p., Federal University of Pará, Belém, 2016.**

Nanoemulsions have been proposed as an option for drug delivery current systems and increasing interest due to several advantages when compared with traditional formulations. Vegetable oils are considered pharmaceutical ingredients of great value as lipid matrix of these systems, such as oil açai, of Amazonian origin oil, which has a number of medicinal benefits such as antioxidant and moisturizing activity, and biocompatibility, increases skin elasticity and acts as a physical barrier. The objective of this study was to obtain nanoemulsion O / W, from açai oil, surfactant and water, through the phase inversion temperature method for topical use. Açai oil was characterized by physical-chemical tests and on the profile of fatty acids by gas chromatography (GC), spectrometry in the infrared (FT-IR) and thermal analysis by thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The surfactant, ketoconazole and their binary mixtures with oil açai were evaluated by DSC. Obtained nanoemulsions making use of açai oil, Brij™ CS20, water and ketoconazole. The characterization of nanoemulsions was performed on the droplet size, polydispersity index (PI), the zeta potential (PZ), morphology and encapsulation efficiency (EE). The açai oil showed acid value (3.78 mg KOH / g), iodine value (71 gl<sup>2</sup> / 100g), saponification number (199 mg KOH / g), refractive index (1.470) and density (0,950g / ml). In GC analysis showed 68.05% of unsaturated fatty acids, being 47.58% oleic acid. Oxidative stability of açai oil Rancimat was about 11.79 hours. The FT-IR spectrometric analysis confirmed bands suggestive of unsaturated fatty acids and thermal analysis it was observed that the thermal degradation occurs above 200 ° C. The combinations of raw materials analyzed by DSC was observed that the incorporation of ketoconazole with açai oil. The nanoemulsion B10 with 0.5% ketoconazole showed 98.31% EE. The transmission electron microscopy showed droplets with spherical shape and after study of PZ (-25.53 ± 10.04 mV), PI (0.37 ± 0.04) and size (128.53 nm ± 10.04) by 30 days, nanoemulsion showed little variation. Thus, it can be said that açai oil has the potential to be used as a pharmaceutical ingredient can be used as oil phase nanoemulsions loaders of fat-soluble substances.

**Keywords:** Ketoconazole; Nanoemulsion; Açai oil; Phase inversion temperature.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dimensões de diferentes estruturas em nanoescala, microescala e macroescala. Fonte: <a href="http://electroiq.com/blog/2013/10/mems-devices-for-biomedical-applications/">http://electroiq.com/blog/2013/10/mems-devices-for-biomedical-applications/</a> .....	18
Figura 2 Representação das camadas da pele e seus constituintes. <a href="http://www.efdeportes.com/efd192/os-efeitos-do-acido-hialuronico.htm">http://www.efdeportes.com/efd192/os-efeitos-do-acido-hialuronico.htm</a> acesso em 04/2016.....	22
Figura 3 Vias de penetração cutânea, onde A é a via intracelular, B é a via intercelular, C é a via axial (fóliculo piloso) e D é via axial (ducto sebáceo) (Thomas Spencer, 2009).....	23
Figura 4 Ilustração do fruto do açaizeiro (SANTANA e COSTA, 2008).....	25
Figura 5 Estrutura química do Cetoconazol. ....	28
Figura 6 Formação de nanoemulsões utilizando o método temperatura de inversão de fases. Onde, FA é fase aquosa; FO é fase oleosa e T é tensoativo. ....	32
Figura 7 Representação esquemática sobre Potencial Zeta. Fonte: Malvern, 2004..	35
Figura 8 Imagem do óleo de açaí. ....	38
Figura 9 Curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) versus tempo (Rancimat) do óleo de açaí apresentando um tempo de indução de 11,79 horas.....	56
Figura 10 Cromatograma obtido do óleo de açaí por CG acoplado ao detector de ionização de chama. ....	57
Figura 11 Espectros vibracionais no FT-IR do óleo de açaí na região espectral de 4000 a 500 $\text{cm}^{-1}$ . ....	60
Figura 12 Curva de TG/DTG do óleo de açaí em atmosfera de $\text{N}_2$ e atmosfera sintética (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a 600 $^{\circ}\text{C}$ .....	61
Figura 13 Curva de calorimetria exploratória diferencial do óleo de açaí em atmosfera de $\text{N}_2$ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a 550 $^{\circ}\text{C}$ .....	62
Figura 14 Curva de calorimetria exploratória diferencial do cetoconazol, do óleo de açaí e da mistura óleo de açaí:cetoconazol, em atmosfera de $\text{N}_2$ (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a 200 $^{\circ}\text{C}$ . ....	64
Figura 15 Curva de calorimetria exploratória diferencial do Brij <sup>TM</sup> CS 20, do óleo de açaí e da mistura óleo de açaí:Brij <sup>TM</sup> CS 20, em atmosfera de $\text{N}_2$ (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a 300 $^{\circ}\text{C}$ . ....	65
Figura 16 Curva de calorimetria exploratória diferencial do Croduret <sup>TM</sup> 50, do óleo de açaí e da mistura Croduret <sup>TM</sup> 50:óleo de açaí, em atmosfera de $\text{N}_2$ (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a 300 $^{\circ}\text{C}$ . ...	66
Figura 17 Especificidade do método de doseamento de cetoconazol por CLAE. A – Cromatograma do cetoconazol (SQR) em metanol a 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B – Cromatograma do cetoconazol (utilizado nas formulações) em metanol a 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; C – Cromatograma do filtrado de nanoemulsão. ....	67

Figura 18 Curva analítica do cetoconazol pelo método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, nas concentrações de 1,0 a 10,0 µg/mL. ....	68
Figura 19 Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta da formulação B10 contendo 0,5% de cetoconazol após 24 horas (1 dia).....	74
Figura 20 Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta da formulação B10 contendo 0,5% de cetoconazol após 30 dias.....	75
Figura 21 Imagens da nanoemulsão B10 com 0,5% de cetoconazol por MET (Magnitude de 30x e 50x, respectivamente). ....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos constituintes para o preparo das nanoemulsões.....	45
Tabela 2	Características físico-químicas do óleo de açaí. ....	52
Tabela 3	Composição percentual de ácidos graxos do óleo de açaí por cromatografia gasosa. ....	58
Tabela 4	Faixa de absorção de ligações moleculares do óleo de açaí. ....	60
Tabela 5	Dados da calorimetria exploratória diferencial das misturas binárias e dos componentes isolados. ....	66
Tabela 6	Resultados de Precisão Intermediária de quantificação de cetoconazol. ...	69
Tabela 7	Resultados de Repetibilidade de quantificação de cetoconazol. ....	69
Tabela 8	Resultados obtidos para o teste de recuperação do cetoconazol. ....	70
Tabela 9	Dados da estabilidade das formulações preparadas com diferentes teores (7%, 8%, 9% e 10%) de Brij <sup>TM</sup> CS20 (B7, B8, B9 e B10, respectivamente).....	71
Tabela 10	Dados da estabilidade das formulações preparadas com diferentes teores (7%, 8%, 9% e 10%) de Croduret <sup>TM</sup> 50 (C7, C8, C9 e C10, respectivamente).....	71
Tabela 11	Média dos tamanhos, índice de polidispersidade e potencial zeta dos sistemas B10 contendo cetoconazol. ....	74
Tabela 12	Média do tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos sistemas B10 sem cetoconazol. ....	74
Tabela 13	Resultado descritos no laudo de análise do cetoconazol fornecido pela Natural Pharma. ....	92

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemists's Society</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia gasosa
CD	Câmara doadora
CR	Câmara receptora
DSC	Calorimetria experimental exploratória
EHL	Equilíbrio hidrófilo lipofilo
FAMES	<i>Fatty acid methyl esters</i>
FID	<i>Flame Ionization Detection</i>
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NE	Nanoemulsão
OSI	<i>Oxidative stability index</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência
T	Temperatura
T	Tempo
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
ΔH	Variação de entalpia

## LISTA DE SÍMBOLOS

r	Coeficiente de Pearson
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
%	Porcentagem
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
g	Grama
mV	Milivolts
mL	Mililitro
M	Molar
J	Joule
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 Nanotecnologia .....	18
2.2 Nanoemulsões .....	20
2.2.1 Estabilidade .....	20
2.2.2 Aplicações .....	21
2.2.3 Vias de Penetração Cutânea de nanoemulsão .....	21
2.2.4 Fase Oleosa .....	24
2.2.4.1 Óleo de açaí .....	24
2.2.5 Cetoconazol .....	27
2.2.6 Tensoativos .....	28
2.2.7 Métodos de Obtenção de nanoemulsões .....	30
2.2.8 Métodos de caracterização .....	32
2.2.8.1 Tamanho da gotícula e Índice de Polidispersidade .....	32
2.2.8.2 Potencial zeta .....	34
2.2.8.3 Aspecto Morfológico .....	35
2.2.8.4 Eficiência de Encapsulação (EE) .....	35
3 OBJETIVOS .....	37
3.1 Geral.....	37
3.2 Específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
4.1 Materiais .....	38
4.1.1 Matérias-primas.....	38
4.1.2 Reagentes e Soluções .....	39
4.1.3 Equipamentos .....	39
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Caracterização do óleo de açaí .....	40
4.2.1.1 Índice de acidez .....	40
4.2.1.2 Índice de saponificação e Índice de iodo (método indireto).....	41
4.2.1.3 Índice de refração.....	42
4.2.1.4 Densidade Relativa .....	42
4.2.1.5 Perfil de ácido graxos por Cromatografia Gasosa .....	43

4.2.1.6 Espectrometria na região do Infravermelho (IV).....	43
4.2.1.7 Estabilidade oxidativa do óleo do açaí – Rancimat .....	44
4.2.1.8 Análise térmica do óleo de açaí .....	44
4.2.2 Estudos de pré-formulação .....	44
4.2.3 Método de preparo das formulações .....	45
4.2.3.1 Incorporação do fármaco cetozonazol.....	46
4.2.3.2 Estudos de estabilidade dos sistemas nanoemulsionados.....	46
4.2.4 Validação Analítica para Doseamento de Cetozonazol a partir das NE por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
4.2.4.1 Condições cromatográficas.....	47
4.2.4.2 Preparação da solução-mãe e suas diluições .....	47
4.2.4.3 Especificidade.....	48
4.2.4.4 Linearidade.....	48
4.2.4.5 Precisão intermediária e Repetibilidade .....	48
4.2.4.6 Exatidão.....	49
4.2.4.7 Limites de detecção e quantificação .....	49
4.2.5 Morfologia.....	50
4.2.6 Eficiência de Encapsulação.....	50
4.2.7 Análise de dados.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Caracterização do óleo de açaí .....	52
5.1.1 Índice de acidez, iodo, saponificação, refração e densidade .....	52
5.1.2 Estabilidade Oxidativa - Rancimat.....	54
5.1.3 Perfil de Ácidos Graxos .....	56
5.1.4 Espectrometria na região do Infravermelho (IV).....	59
5.1.5 Estabilidade térmica do óleo de açaí.....	61
5.2 Ensaio preliminares de avaliação dos componentes da formulação .....	63
5.2.1 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	63
5.3 Validação Analítica para Doseamento de Cetozonazol por CLAE .....	67
5.3.1 Especificidade .....	67
5.3.2 Linearidade.....	68
5.3.3 Precisão Intermediária e Repetibilidade .....	69
5.3.4 Exatidão .....	70
5.3.5 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ).....	70

5.4 Tamanho da gotícula, Índice de polidispersidade (IP) e Potencial Zeta (PZ) .....	71
5.4.1 Efeito da concentração do Tensoativos.....	71
5.4.2 Efeitos da Concentração de Cetoconazol .....	73
5.5 Morfologia.....	75
5.6 Eficiência de Encapsulação.....	76
6 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS: .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Analisando o mercado de desenvolvimento de produtos, o uso da nanotecnologia vem crescendo de forma significativa nos últimos anos. Numerosas pesquisas trouxeram avanços e inovações jamais vistas anteriormente (PAESE, 2008; STRÖHER *et al.*, 2010).

A nanotecnologia aplicada a área da saúde, apresenta sistemas nanoestruturados que possuem área de superfície elevada, considerados vetores para a administração de substâncias lipofílicas, possibilitando uma liberação homogênea e, muitas vezes, controlada de substâncias ativas, aumentando assim a resposta terapêutica no sítio de ação por tempo prolongado (PAESE, 2008). Por este motivo, a busca por novas alternativas tecnológicas que aumentem a eficiência de fármacos já conhecidos tem sido intensificado (ETHERIDGE *et al.*, 2012).

Os sistemas nanoestruturados, como as nanoemulsões, as nanocápsulas, nanopartículas, cristais líquidos, entre outros, permite o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a reintrodução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados na terapêutica. Isso, porque esses sistemas podem promover alterações nas características de solubilidade do fármaco, diminuição dos efeitos adversos e/ou colaterais, aumento da eficácia terapêutica, proteção do fármaco frente a fatores de degradação, tais como a luz e o calor, entre outras aplicações (ALICE *et al.*, 2011).

Dentre os sistemas, destacam-se as nanoemulsões, as quais são sistemas dispersos formados a partir de dois líquidos imiscíveis e estabilizadas por um agente tensoativo. Apresentam na fase interna gotículas de tamanho nanométrico, na faixa de 20-200nm, o que lhe traz vantagens como, melhor espalhabilidade, melhor penetração cutânea e hidratação (TRADOS *et al.*, 2004).

A obtenção de nanoemulsões pode envolver alta ou baixa energia de emulsificação. As técnicas que fazem uso de alta energia recorrem à energia mecânica por meio de alta tensão de cisalhamento, geralmente por meio de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom (FERNANDEZ *et al.*, 2004). As técnicas de baixa energia de emulsificação, como a temperatura de

inversão de fases, utilizam as propriedades físico-químicas dos sistemas para obterem emulsões com gotas muito pequenas (TRADOS *et al.*, 2004).

O uso de óleos vegetais no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos vem sendo constantemente relatado em literatura (ANDRADE *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2011). Pois apresenta grande valor ao ser usado como insumos para produção de novos medicamentos, alimentos e cosméticos, sua utilização fora dos limites da Amazônia, valoriza a região e impulsiona a economia local. Dentre os óleos fixos relatados, destacam-se, os extraídos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart), pracaxi (*Pentaclethra maculosa*), castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*), entre outros (COSTA *et al.*, 2013).

A palmeira *Euterpe oleraceae* Mart, conhecida popularmente como açaí, é muito comum na Região Amazônica. Apresenta um fruto de onde tem sido muito estudado nos últimos anos, por mostrar potenciais benefícios à saúde devido a sua composição de ácidos graxos, alta capacidade antioxidante e biocompatibilidade (BLOISE, 2003; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008).

O óleo fixo de açaí, extraído da polpa do fruto, possui grande variedade de polifenóis conhecidos por sua propriedade antioxidante, anti-inflamatória e anti-proliferativa (BORGES *et al.*, 2013). Além disso, o óleo é constituído de ácidos graxos essenciais com potencial de emprego em formulações farmacêuticas e cosméticas (MANTOVANI *et al.*, 2003; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008).

Em razão das diversas vantagens apresentadas o óleo de açaí torna-se interessante no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo fármacos lipossolúveis.

Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo a obtenção e caracterização de nanoemulsão para uso tópico, a partir do óleo de açaí, pela técnica de temperatura de inversão de fases.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia baseia-se na habilidade de manipular, caracterizar, e organizar materiais em tamanhos nanométricos (Figura 1) (LEE, 2004). Nanoestruturas apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (Quina 2004).

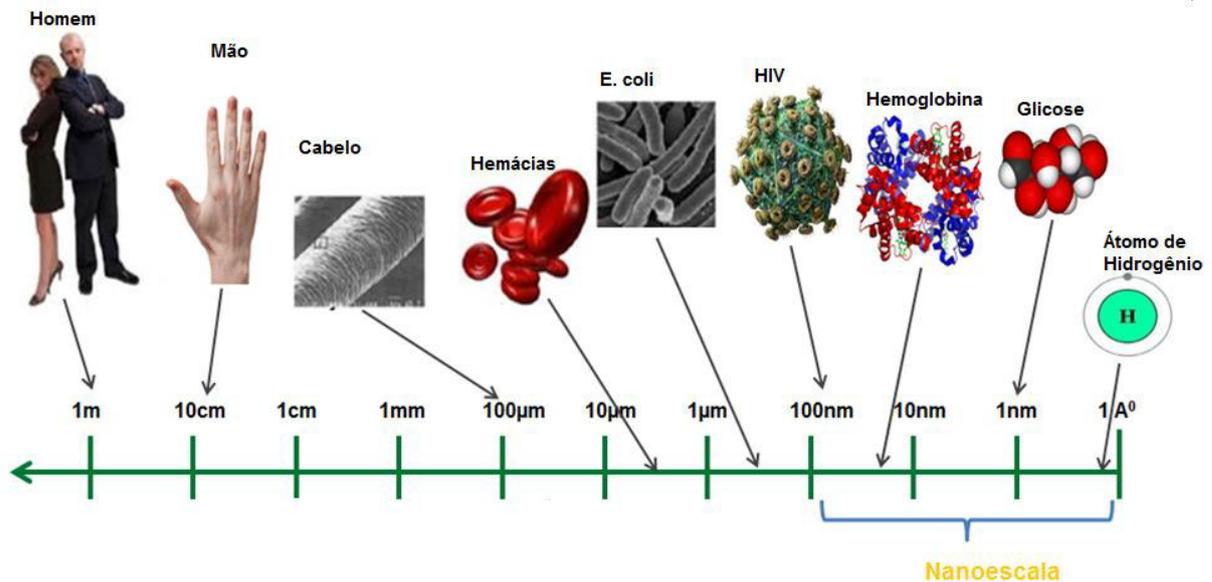


Figura 1: Dimensões de diferentes estruturas em nanoescala, microescala e macroescala. Fonte: <http://electroiq.com/blog/2013/10/mems-devices-for-biomedical-applications/>

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar, que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações, nos setores de energia, eletrônica, cosmetologia e medicina. Vem sendo explorado industrialmente com a fabricação de novos cosméticos, medicamentos, tintas, catalisadores, revestimentos, tecidos, etc (BERGMANN-ROSSI, 2008).

Dentro da nanotecnologia, a nanomedicina surgiu como uma nova oportunidade, a partir do uso de nanomateriais no tratamento e diagnóstico de doenças. Neste cenário, a busca por sistemas de entrega de drogas foi um dos segmentos que mais cresceu e que mais se publica estudos (BERGMANN-ROSSI, 2008).

Entre outras aplicações observa-se, o uso de nanopartículas de ouro para diversos aproveitamentos em medicina como em biossensores, diagnóstico de doenças e veículo para entrega de moléculas dentro das células. Nanopartículas magnéticas têm se mostrado altamente eficientes para atuação em sistemas de *drug delivery*, como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética e na terapêutica do câncer. Nanotubos de carbono têm sido amplamente utilizados como plataformas na fabricação de biossensores para detectar biomoléculas. Além disso, estudos têm mostrado que a funcionalização deste material permite sua atuação como moléculas carreadoras de medicamentos para aplicações em *drug delivery* e tem sido empregado com sucesso no tratamento de câncer (CANCINO *et al.*, 2014).

Sistemas lipossomados de dimensões nanométricas também têm tido uma diversidade de aplicações como sistemas *drug delivery*. Os lipossomas tem sido empregados no tratamento de doenças parasitárias, microbianas, imunológicas e no tratamento do câncer. AmBisome<sup>®</sup> é a Anfotericina B lipossomal, seus lipossomas são compostos por uma única camada lipídica dupla, onde a droga se liga à membrana num complexo de cargas com o distearoilfosfatidilglicerol e medem aproximadamente 60 nm de diâmetro. Ele foi desenvolvido com o intuito de diminuir os efeitos indesejáveis da terapia com o fármaco não lipossomado (MACHADO *et al.*, 2007).

Além dos sistemas já citados, há muitos estudos e aplicações comerciais para os sistemas nanoemulsionados, microemulsionados, nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas (SHAH *et al.*, 2014).

As nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos, nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas de tamanho nanométrico, na presença de um agente emulsionante. As nanoemulsões tem uma vasta lista de aplicações, tendo sucesso como veículo de fármacos de administração oral, tópica, oftálmica e parenteral (FRONZA *et al.*, 2007).

Como pode ser observado, há diversos modelos de sistemas de liberação nanoestruturados. No entanto este trabalho ressaltará aspectos relacionados à nanoemulsões de aplicação cutânea.

## 2.2 Nanoemulsões

Nanoemulsões também são conhecidas como emulsões ultrafinas, miniemulsões, submicroemulsões e microemulsões instáveis (ABOOFAZELI, 2010; FERNANDEZ *et al* 2004).

Por sua vez, nanoemulsões fazem parte de uma classificação de emulsões, em que o tamanho das gotículas encontra-se em escala nanométrica, em torno de 20 – 500 nm (FERNANDEZ *et al.* 2004; PEY *et al.*, 2006). Sendo que, nanoemulsões com gotículas inferiores a 200 nm apresentam-se com características macroscópicas transparentes ou translúcidas, enquanto que tamanho superior a 200 nm apresenta-se leitosa (TADROS, 2004; CAPEK, 2004).

### 2.2.1 Estabilidade

As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis por um longo período de tempo. Esta estabilidade coloidal inerente das nanoemulsões deve-se ao processo de obtenção das mesmas, que lhe atribui estabilização estérica quando se faz uso de tensoativos não iônicos e/ou polímeros; e ao tamanho nanométrico das gotículas permite que o movimento browniano ou taxa de difusão supere a força da gravidade, prevenindo assim os fenômenos de instabilidade (TRADOS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; ABOOFAZELI, 2010). Além disso, a coalescência também é minimizada, pois os glóbulos não deformam e a espessura da película interfacial de tensoativo (em relação ao raio da gota) da gotícula evita a ruptura (TRADOS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

A instabilidade pode ocorrer também através do *Ostwald ripening*. Este processo é acarretado quando um sistema encontra-se polidisperso e com diferença de solubilidade entre as gotículas, acarretando a difusão das gotículas menores para as maiores, causando crescimento da gotícula ao longo do tempo (*Ostwald ripening*), formando uma única gota (separação de fases, por exemplo, por cremação e sedimentação) (TRADOS *et al.*, 2004; CAPEK, 2004).

### 2.2.2 Aplicações

As nanoemulsões O/A são usadas há mais de 40 anos como fonte de calorias de ácidos graxos essenciais e nos últimos anos tem sido empregadas como sistema de liberação de fármacos (BRUXEL *et al.*, 2012). Shakeel e Colaboradores (2007) relatam esses sistemas nanoemulsionados podem incorporar ativos hidrofóbicos e atuar como sistemas carreadores, tais como, antimicrobianos, antioxidantes, e nutracêuticos. Isso faz com que nanoemulsões tenham uma vasta lista de aplicações, tendo sucesso como veículo de fármacos de administração oral, tópica, oftálmica e parenteral.

Sua utilização é também descrita por Aboofazeli (2010), como um grupo de partículas dispersas usadas como veículos para fins farmacêuticos e cosméticos, diagnóstico, terapias com drogas e biotecnologias.

### 2.2.3 Vias de Penetração Cutânea de nanoemulsão

A aplicação tópica é conhecida como a principal via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos. Entre outras vantagens, destaca-se por evitar o metabolismo de primeira passagem dos fármacos (LIERBERMAN *et al.*, 2001; LIRA, *et al.*, 2004).

Existem componentes/substâncias “facilitadores” que aumentam o fluxo do fármaco através das camadas mais profundas da pele, onde exercerão sua ação terapêutica (KREILGAARD, 2002; LIRA *et al.*, 2004).

Quando nos referimos à penetração e absorção cutânea, estes são utilizados com intuito de descrever ativos que atuam topicamente, como formulações cosméticas e dermatológicas, todavia quando se utiliza permeação cutânea ou absorção transcutânea são para aquelas formulações com ação sistêmica que atuam pela via transdérmica (LEONARDI, 2007).

A penetração é o processo pelo qual o ativo passa somente pelo estrato córneo, enquanto que a permeação é quando o ativo passa pela epiderme e alcança a derme (BABY, 2001).

As substâncias ativas penetram o estrato córneo por difusão passiva, tomando este como uma membrana artificial semipermeável, a velocidade de movimentação durante este processo é definido pela concentração do ativo no veículo, sua solubilidade e o coeficiente de partição óleo/água no estrato córneo e no veículo (ANSEL *et al.*, 2000).

A pele é o maior órgão do corpo humano, compreendendo 10 a 15% do peso corporal, e realiza várias atividades para regular e defender o organismo (LEONARDI, 2004; CLARK *et al.*, 2007). Este órgão se destaca por sua importância funcional, como a de proteger o organismo contra muitos agentes do ambiente, sendo a epiderme, o principal constituinte que realiza essa barreira defensiva (SILVA, 2002). Conforme a Figura 2, a pele apresenta a epiderme (camada superficial) seguida pela derme (HUANG *et al.*, 2005; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

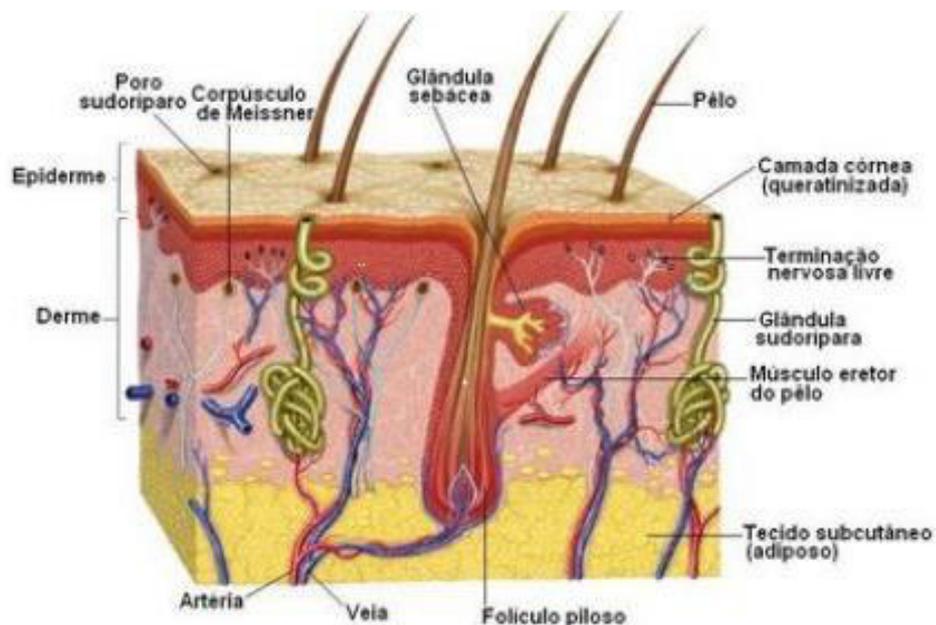


Figura 2 Representação das camadas da pele e seus constituintes. <http://www.efdeportes.com/efd192/os-efeitos-do-acido-hialuronico.htm> acesso em 04/2016

A epiderme é uma estrutura estratificada e avascular, constituída por quatro estratos, sendo a córnea a mais superficial. O estrato córneo apresenta uma estrutura bifásica de lipídio/proteína e é formado por células sem núcleos (corneócitos), achatadas e mortas, dispersas em uma matriz de lipídios. Essa matriz é composta por ceramidas, ácidos graxos, esteroides e trigliceróis. Sendo assim,

este estrato constitui o principal obstáculo limitante à difusão percutânea de fármacos (PIROT, *et al.* 1998; MOSER *et al.*, 2001; TAKAGI *et al.*, 2003).

No entanto, a permeação de substâncias através da pele ocorre principalmente através de duas vias, sendo elas: a via transcelular, na qual o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica; e a via intercelular, por meio da qual o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos pela matriz lipídica intercelular. Existe também, a anexial, onde os fármacos são absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Figura 3) (PRISTA *et al.*, 1991; BARRY, 2004; PATHAN, 2009)

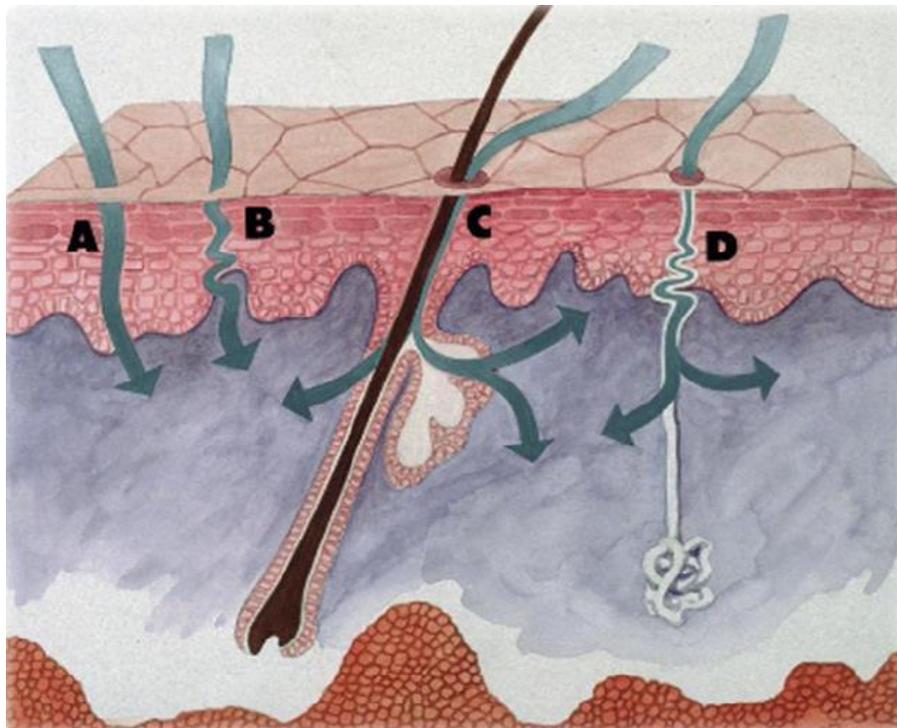


Figura 3 Vias de penetração cutânea, onde A é a via intracelular, B é a via intercelular, C é a via axial (folículo piloso) e D é via axial (ducto sebáceo) (Thomas Spencer, 2009).

A via anexial proporciona a penetração rápida de substâncias devido à superfície da epiderme ser permeável nestes locais. É a principal via de transporte de iões e de moléculas de elevado peso molecular, sendo que estes dificilmente atravessam a camada córnea (OLIVEIRA e SANTOS, 2011). Porém, os apêndices cutâneos constituem 0,1% da superfície da pele, sendo que a via transepidérmica constitui a principal via de penetração de fármacos (MARTINS e VEIGA, 2002).

A via transepidérmica envolve a passagem das moléculas pela camada córnea. Os compostos polares, como a água, penetram pela via intracelular enquanto os compostos apolares, pela sua afinidade lipídica, difundem-se ao longo dos espaços intercelulares com penetração mais lenta. A via intercelular é considerada a principal via de passagem, embora muitas moléculas atravessem a camada córnea por ambas as vias. Esta camada obriga o fármaco a difundir-se através de uma matriz lipídica intercelular, mas a penetração da maioria dos compostos está dependente da lipofilia e do tamanho molecular (OLIVEIRA e SANTOS, 2011; LANE, 2013).

Entretanto, a penetração de substâncias na pele se faz de maneira complicada, pois é dependente das propriedades do ativo e de seu comportamento quando incorporado a um veículo, considerado um desafio, pois deve permitir a entrada do ativo e não de outros agentes exógenos (CHORILLI *et al.*, 2007).

#### **2.2.4 Fase Oleosa**

Óleos e gorduras de origem natural são largamente utilizados como veículos de substâncias ativas para aplicação tópica e como componentes básicos em diversos produtos nas áreas farmacêutica e cosmética. Sua utilização é justificada por apresentar sua composição química semelhante aos lipídios naturais encontrados na pele humana. Esses compostos são classificados como seguros para uso tópico na pele íntegra (BLOISE, 2003). Dessa forma, é importante observar a escolha de óleo compatível com o fármaco ativo, de forma que possa ser inerte ou que atribua propriedades ao fármaco, como por exemplo, o óleo de açaí.

##### **2.2.4.1 Óleo de açaí**

O açaizeiro, conhecido popularmente por açaí, é uma oleaginosa que pertence à família *Arecaceae* e seu nome científico é *Euterpe oleracea* Martius.

Ocorre espontaneamente na região Amazônica, distribuindo-se pelas várzeas do estuário amazônico, ainda pelo Baixo Amazonas e pelo litoral do Amapá, Pará, Piauí, Guianas, Venezuela e Bolívia (CALZAVARA, 1972; PESSOA e TEIXEIRA, 2012).



Figura 4 Ilustração do fruto do açaizeiro (SANTANA e COSTA, 2008).

O açaí (Figura 4), fruto do açaizeiro, é consumido na forma de bebida, preparações alimentícias, suplementos alimentares, além de seus usos na medicina popular em preparações para o tratamento de diarreia (HEINRICH *et al* 2014; AMSELLEM-LAUFER, 2015).

Várias pesquisas relatam que o açaí é rico em polifenóis, destacando-se as antocianinas. Destas as antocianinas referidas, foram encontradas a cianidina glicosídica, a cianidina-3-rutosídica, a cianidinas-3-sambubiosídicas, a feonidina-3-rutosídica, as proantocianidinas, como os polímeros e outros flavonóides, como a orientina, a isovitexina, a escoparina e a taxifolina deoxihexose (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; GALLORI *et al.*, 2004; COÏSSON *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006).

As antocianinas são glicosídeos das antocianidinas e fazem parte do grupo dos flavonóides, onde o núcleo básico é a estrutura do íon 4-hidroxiavilium, e são compostos de duas ou três partes: a aglicona (antocianidina); o carboidrato e,

freqüentemente, um grupo acil (GUIMARÃES, 1987). As antocianinas são pigmentos naturais bastante conhecidos, pois determinam a cor de uma grande variedade de vegetais, sendo as responsáveis pela cor violácea à roxa do açaí (DEL POZO INSFRAN *et al.*, 2004).

Na medicina tradicional, utiliza-se várias partes do açaí, sendo a sua raiz associada com *Carica papaya* (mamão), *Citrus* sp. (lemon) e *Quassia amara* (quina) como antimalárico (VIGNERON *et al.*, 2005) e o óleo extraído do seu fruto como antidiarreico (PLOTKIN e BALICK, 1984).

Estudos relatam que a polpa de açaí não apresentou efeito genotóxico em medula óssea de rato ou células de rim e fígado e que desempenhou papel na inibição da genotoxicidade induzida pela DXR agente antitumoral (RIBEIRO *et al.* 2010).

Os extratos da polpa do açaí inibiram a produção de óxido nítrico e a expressão de iNOS a partir de células em cultura. Esta ação parece ser decorrente de ação direta dos extratos na via de produção do NO, molécula que apresenta diversas atividades fisiológicas, tais como vasodilatação, neurotransmissão, além de atividades tumoricidas e citotóxicas (MATHEUS *et al.*, 2006).

Pacheco-Palencia e colaboradores (2008) relataram que as antocianinas são úteis na prevenção e tratamento de distúrbios cutâneos. Demonstram, também em seus estudos, que a composição química do óleo de açaí influencia significativamente na proliferação celular pela atividade anti-proliferativa dos polifenóis em culturas de células de câncer. Por sua vez, estudos realizados por Del Pozo-Insfran e colaboradores (2006), elucidaram a indução da atividade antiproliferativa e pro-apoptótica dos compostos polifenólicos do açaí contra células HL-60 causadores de leucemia.

Monge-Fuentes e Colaboradores (2014), em seus experimentos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento do melanoma com terapia fotodinâmica mediada por nanossistema com óleo de açaí, contribuíram com resultados que apoiam a aplicação deste tipo de tratamento como terapia adjuvante a procedimentos cirúrgicos, sendo seletiva ao tecido tumoral.

Além desses efeitos, Rocha e Colaboradores (2007) demonstraram que a referida planta, apresenta efeito vasodilatador, e que este efeito é dependente na ativação de via NO-GMPC e também pode envolver a liberação do fator de

hiperpolarização, o que sugere uma possibilidade do uso do açaí como planta medicinal no tratamento de doenças cardiovasculares.

Trabalhos realizados, revelaram a capacidade anti-oxidante do açaí e a sua utilização como alimento funcional, dermocosmético e até mesmo como nutracêutico (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; COÏSSON *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007).

O óleo do açaí contém vários compostos fenólicos, destacando-se o ácido vanílico. Tais compostos fenólicos apresentam propriedades anti-oxidantes, o que torna este óleo uma alternativa próspera em diversas áreas, como a de alimentos, suplementos, cosméticos e medicamentos (PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008).

O óleo fixo de açaí corresponde a aproximadamente 50% da polpa, apresenta um perfil lipídico rico em ácidos graxos mono e poli-insaturados e devido seus benefícios à saúde e suas propriedades sensoriais singulares, este óleo torna-se uma matéria prima valiosa (SCHAUSS *et al.*, 2006; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008). Lubrano e Colaboradores (1994) mostraram que o óleo do açaí é constituído principalmente pelos ácidos graxos oleico, palmítico e linoleico. Esses ácidos graxos são essenciais para a construção da membrana celular, hidratação cutânea, desempenham papéis biológicos importantes no metabolismo e podem ser convertidos nos seus sais correspondentes por hidrólise alcalina, usados como aditivo em cremes, sabões, emulsões cosméticas e sistemas *drug delivery* (BLOISE, 2003; FERRARI, 2011).

### **2.2.5 Cetoconazol**

O cetoconazol é um derivado imidazólico com amplo espectro de ação antifúngica e alguma atividade antibacteriana, utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e tópicas (RANG *et al.*, 2000).

O cetoconazol, sintetizado em 1979, está entre os azóis antifúngicos mais usados na terapêutica, seu mecanismo de ação consiste na inibição das enzimas P-450 fúngicas, responsáveis pela síntese do ergosterol, o principal esterol encontrado na membrana das células fúngicas. A depleção do ergosterol altera a fluidez da membrana, levando à morte do fungo (GHANNOUM *et al.*, 1999).

Porém, para uma efetiva terapia é necessário que o cetoconazol seja liberado no sítio de infecção numa adequada concentração para produzir um efeito farmacológico (FUCHS e WANNMACHER, 1998).

O cetoconazol é um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em cloreto de metileno, solúvel em metanol e ligeiramente solúvel em álcool, com ponto de fusão entre 148 °C e 152 °C e peso molecular de 531,43 g/mol. Seu nome químico é *cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)-metil]-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina (Figura 5) (SOUTO e MULLER, 2005).

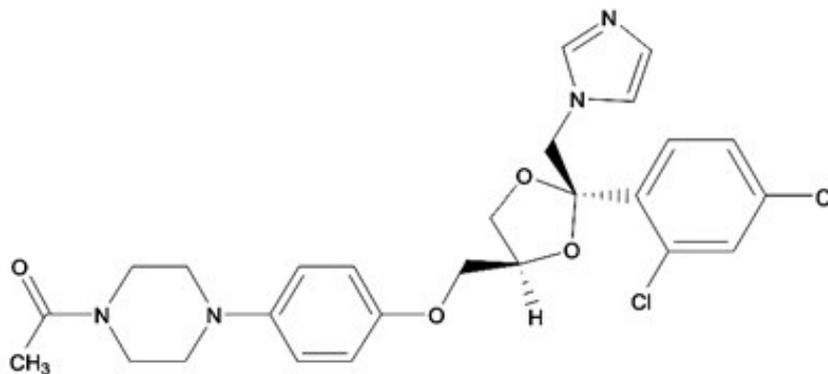


Figura 5 Estrutura química do Cetoconazol.

### 2.2.6 Tensoativos

Os tensoativos são moléculas orgânicas com uma região hidrofílica e uma região lipofílica. Essa característica de sua estrutura química permite sua aglomeração entre fases oleosa e aquosa. Assim quando se mistura óleo e água para a obtenção de emulsões, o tensoativo age, principalmente, através da diminuição da tensão interfacial entre as duas fases, facilitando a formação das emulsões (FLORENCE e ATWOOD, 2003; CAPEK, 2004).

Por sua estrutura molecular peculiar, os tensoativos são chamados de moléculas anfifílicas. A região hidrofóbica são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas, ou em alguns casos, menos comuns, anéis aromáticos ou

heterocíclicos. A região hidrofílica pode ser catiônica, aniônica ou não iônica. De modo geral, os tensoativos são classificados de acordo com a natureza do agrupamento anfifílico (FLORENCE e ATWOOD, 2003).

Além dessa classificação os tensoativos podem ser sistematizados pelo seu grau de lipofilia e hidrofilia, que é escalonado pelo equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL). O valor do EHL de um tensoativo reflete se este é mais hidrófilo ou mais lipofílico. Substâncias de EHL muito baixo, ou menor que três, são lipofílicas, apresentando apenas propriedades antiespumantes. Substâncias de EHL entre três e nove já apresentam propriedades emulsificantes dando origem a emulsões do tipo A/O. Substâncias de EHL entre oito e dezesseis já começam apresentar características hidrofílicas dando origem a emulsões do tipo O/A. Substâncias de EHL acima de dezesseis já apresentam características hidrofílicas atuando como solubilizantes (PRISTA,1990)

Quando adicionados a uma mistura de óleo com água os tensoativos tendem a orientar no seguinte sentido: grupo polar, fase aquosa e grupo apolar fase oleosa. O aumento da concentração do tensoativo requer que as moléculas se ordenem, de maneira a reduzir a interação entre as caudas apolares e o meio hidrófilo. Uma vez atingida à concentração micelar crítica, ocorre à formação de micelas, e as moléculas de tensoativo passam a interagir entre si. Três interações são dominantes e determinam o número de moléculas ideal para a formação e o formato do agregado: repulsão entre os grupamentos polares, interações entre as cadeias apolares e entre as interfaces polar-apolar. A redução ou o aumento da concentração do tensoativo e do solvente favorece a formação de diferentes sistemas, tais como as microemulsões, cristais líquidos e emulsões. Sendo que as interações intermicelares, associadas às interações entre as moléculas da micela e à geometria do tensoativo influenciam o tipo de sistema formado. O valor do EHL, também influencia na natureza dos sistemas formados, cristais líquidos liotrópicos dependem do grau de hidrofilia dos tensoativos, assim como da sua concentração (GUSTAFFON *et al.*, 1997).

A seleção de tensoativos adequados para desenvolver uma emulsão estável é outro fator muito importante (GULLAPALLI e SHETH, 1999). Devido a baixa toxicidade e estabilidade frente a aditivos, os tensoativos não-iônicos tem sido muito usado em emulsões farmacêuticas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Entre os tensoativos de características não iônica, biodegradáveis e bastantes utilizados em diversos tipos de formulações, encontra-se o derivado de glicol denominado polietilenoglicol, como o óleo de rícino hidrogenado 40 OE (PEG 40 hydrogenated castor oil) EHL 14,1. Além desse, outro tensoativo com mesmas características é o Cetareth 20 (Álcool cetoestearílico etoxilado), comercialmente conhecido como Brij<sup>TM</sup> CS20 com EHL de 15,7 (Croda, 2014).

O óleo de rícino hidrogenado 40 OE é um tensoativo derivado do óleo de mamona e funciona principalmente como emulsionante óleo em água (O/A). Numerosos estudos publicados utilizam esse tensoativo sistemas carreadores (Cosmetic Ingredient Review, 2012).

Segundo a Cosmetic Ingredient Review (1999), o Cetareth 20 é utilizado em diversas formulações para a pele, pois ele melhora a absorção de drogas, além de ser tolerante a diversos níveis de pH.

### **2.2.7 Métodos de Obtenção de nanoemulsões**

As nanoemulsões necessitam de energia para sua formação. Neste sentido, podem ser aplicados os métodos de baixa energia, que fazem uso da energia química armazenada no sistema, ou de alta energia de emulsificação, que utiliza energia mecânica (SOLÉ *et al.*, 2010).

Os métodos que envolvem alta energia de emulsificação são baseados na geração de energia mecânica através de cisalhamento capaz de deformar e quebrar as gotículas da fase dispersa formando glóbulos de menor diâmetro, desde que a pressão de Laplace seja superada (Lei de Young-Laplace). Este método utiliza aparelhos como os agitadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão, geradores de ultrassom e microfluidizador (FERNANDEZ *et al.* 2004; TADROS *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006).

A homogeneização sob alta pressão é um método amplamente descrito para obtenção de nanoemulsões carreadoras de fármacos, o qual consiste na passagem de uma dispersão grosseira por um orifício, sob pressão elevada, em turbulência

intensa, produzindo então uma emulsão com um diâmetro de gotícula extremamente pequeno (KOURNIATIS *et al*, 2010).

Outro método, de alta energia, muito utilizado é a emulsificação por ultrassom ocorre principalmente através de dois mecanismos. Em primeiro lugar, o uso de um campo acústico produz ondas interfaciais que se tornam instáveis, resultando na erupção da fase de óleo no meio da água em forma de gotículas. Em segundo lugar, a aplicação de baixa frequência ultrassônica provoca a cavitação acústica, isto é, a formação e subsequente colapso de microbolhas por flutuações de pressão de uma onda de som simples. Esse segundo evento é responsável pela quebra das gotículas em tamanho nanométricos (SUTRADHAR e AMIM, 2013).

Os métodos que utilizam baixa energia de emulsificação estão associados à transição de fases que ocorre durante o processo de emulsificação. Quando este processo ocorre à temperatura constante e variando-se a concentração do óleo ou da água, é denominado emulsificação por inversão de fases (Emulsion Phase Inversion - EPI). Quando há manutenção constante das frações volumétricas e variação da temperatura do sistema é conhecido como temperatura de inversão de fases (Phase Inversion Temperature – PIT) (FERNANDEZ , *et al.*, 2004), sendo este último o método selecionado para realização deste trabalho.

A emulsificação por temperatura de inversão de fase é um método de baixa energia, onde a temperatura do sistema de emulsão é aumentada para alterar o padrão de solubilização do tensoativo (hidrofílico para lipofílico) que forma microemulsões bicontínuas seguido por inversão da emulsão. O processo envolve quatro passos (Figura 6):

(A) A temperatura é abaixo do PIT, ele apresenta uma macroemulsão e os surfactantes não iônicos, na maior parte hidrofílica;

(B) A temperatura é aumentada; os tensoativos tornam-se gradualmente lipofílico e são solubilizados pela fase de óleo;

(C) São formadas microemulsões;

(D) O sistema é arrefecido rapidamente (choque térmico) e ocorre a formação das nanoemulsões (Figura 6) (ANTON e VANDAMME, 2009).

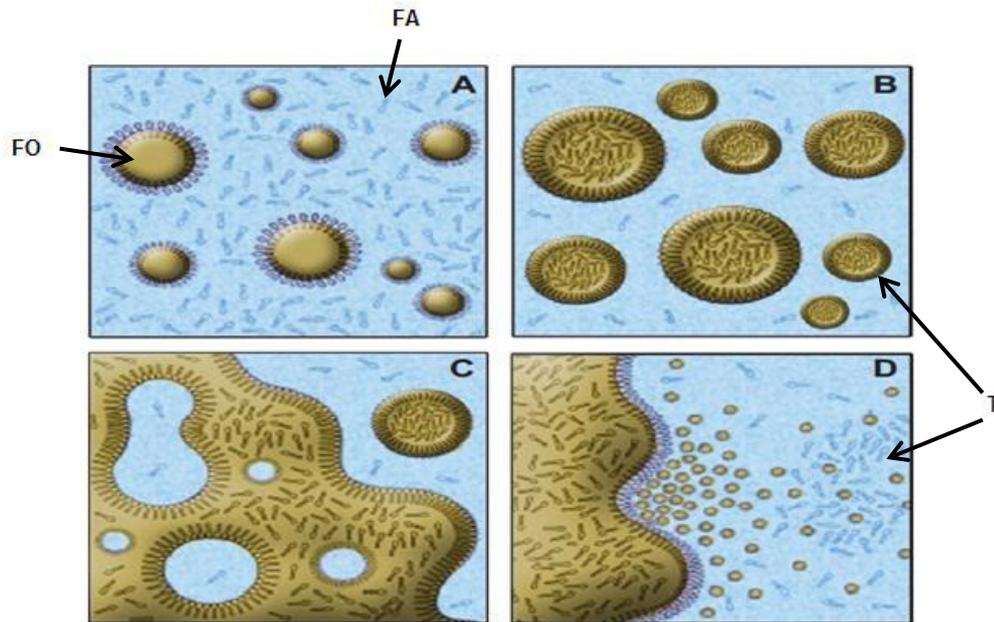


Figura 6 Formação de nanoemulsões utilizando o método temperatura de inversão de fases. Onde, FA é fase aquosa; FO é fase oleosa e T é tensoativo.

Disponibilizando um rápido resfriamento ou aquecimento das emulsões formadas em temperatura adequada, podem formar emulsões cineticamente estáveis e com baixo índice de polidispersividade (SOLANS *et al.*, 2005; EE *et al.*, 2008).

## 2.2.8 Métodos de caracterização

A estabilidade de uma emulsão é de extrema importância nos vários procedimentos industriais e produtos emulsionados. A fim de caracterizar estes sistemas vários estudos são sugeridos na literatura como: a determinação do tamanho dos glóbulos da fase dispersa, além da carga de superfície (potencial zeta), morfologia, da eficiência de encapsulação e perfil de liberação *ex vivo*.

### 2.2.8.1 Tamanho da gotícula e Índice de Polidispersidade

A análise do tamanho deve ser realizada após o preparo e durante seu armazenamento, pois quanto mais rápido ocorrer a alteração do tamanho dos

glóbulos, menor será a sua estabilidade (LIEBERMAN *et al.* 1988; JEONG *et al.*, 2001; KULMYRZAEV & SCHUBERT, 2003; ROLAND *et al.*, 2003).

O Tamanho e o índice de polidispersidade são analisados pela técnica da espectrometria de correlação de fótons (ECF). Seu mecanismo baseia-se no movimento browniano das gotículas em suspensão, onde gotículas menores apresentam movimentos rápidos e as maiores apresentam movimentos lentos. A técnica ECF mensura os movimentos brownianos e relaciona estes movimentos ao tamanho das gotículas, reproduzindo gráfico onde a intensidade diferencial ou cumulativa são expressos em função do diâmetro da gotícula (MARVEN, 2004).

Por sua vez, o índice de polidispersidade (IP) é uma medida da distribuição do tamanho das gotículas. Quando o resultado está próximo de zero, significa que a população da amostra é mais homogênea, enquanto que resultados entre 0,1 e 0,2 indicam uma distribuição estreita, e índices acima de 0,5 demonstram uma distribuição muito ampla (HOMMOSS, 2009).

Esta técnica, por convenção, é formada por um laser monocromático em um comprimento de onda fixo como fonte de luz. O laser converge para a amostra, através de uma lente de focalização. A luz é espalhada em vários ângulos pelas gotículas presentes na amostra. Um detector analisa a luz espalhada e as flutuações de intensidade da luz espalhada e converte em pulsos elétricos, os quais são transmitidos em um dispositivo de correlação digital. Este suscita uma função de autocorrelação, a partir da qual se relaciona com coeficiente de difusão das gotículas, que, por sua vez, com o tamanho das gotículas (MARVEN, 2004).

Assim, pode-se calcular o tamanho destas gotículas pela taxa de variação da intensidade da luz dispersa. Os sinais de intensidade detectados são utilizados para calcular uma função de auto-correlação, a partir da qual se obtém o coeficiente de difusão, o diâmetro esférico pode ser calculado aplicando-se a equação de Stokes-Einstein, que relaciona o coeficiente de difusão de uma partícula com seu diâmetro ( $r$ ), Equação 1:

$$r = kT/3\pi\rho D$$

**Equação 1**

Onde,  $k$  é a constante de Boltzmann;  $T$  é a temperatura absoluta;  $\rho$  é a viscosidade do meio externo; e  $D$  é o coeficiente de difusão.

### 2.2.8.2 Potencial zeta

Assim como o tamanho da gotícula, o potencial zeta (PZ) é indicativo da estabilidade de nanoemulsões, tendo em vista que gotículas com carga agregam-se menos durante a estocagem devido à repulsão eletrostática (MALVERN, 2004). Portanto, alterações desse valor podem corresponder a mudanças na constituição e características da amostra. (LIEBERMAN, *et al.* 1988; STACHURSKI & MICHALEK, 1996; GU & LI, 1997).

O PZ reflete a carga da interface das gotículas dispersas em um campo elétrico carregado. Esta medida é a diferença de potencial existente entre a superfície de íons fortemente ligados à superfície da gotícula e uma região neutra (não carregada) da solução, onde há uma diferença relevante da viscoelasticidade, quando comparada à solução adjacente aos glóbulos (Figura 7). É importante um valor negativo ou positivo e elevado do potencial zeta (25 mV ou maior, em valor absoluto). Isso significa que a força repulsiva da dupla camada é maior do que a força atrativa de London, evitando, desta maneira, uma possível flocculação (LIEBERMAN *et al.* 1988; BENITA & LEVY, 1993; ROLAND *et al.*, 2003). Marcato (2009) descreve que excelente estabilização eletrostática é adquirida quando o PZ maior que +30 mV ou que -30 mV.

As gotículas eletricamente carregadas, quando submetidas a um campo elétrico, movimentam-se na direção de um eletrodo de carga contrária. Visto que a velocidade de mobilidade é proporcional ao potencial da superfície da partícula, o potencial zeta pode ser estimado a partir da medição da velocidade das partículas (GUIMARÃES e RÉ, 2011).

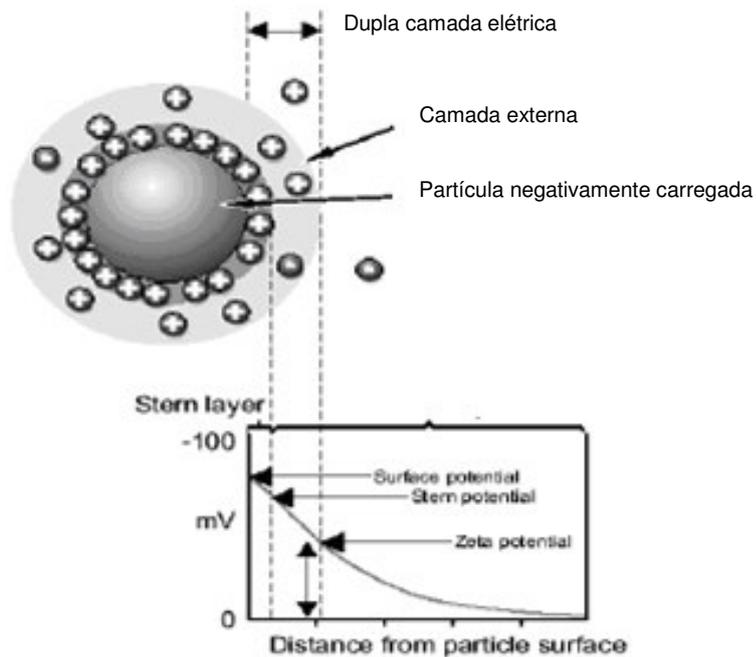


Figura 7 Representação esquemática sobre Potencial Zeta. Fonte: Malvern, 2004.

### 2.2.8.3 Aspecto Morfológico

A caracterização da morfologia do sistema pode ser realizada por microscopia eletrônica de transmissão, através do direcionamento um feixe de elétrons que é irradiado sobre uma amostra ultra fina, interagindo com esta enquanto a atravessa. A partir desta interação a imagem é formada, em seguida, é ampliada e focada em um dispositivo de imagem. O contraste na imagem formada ocorre pela absorção de elétrons pelo material devido a espessura e composição do material (GALLETI, 2003).

### 2.3.8.4 Eficiência de Encapsulação (EE)

Alguns estudos mostraram que uma elevada porcentagem da substância ativa não está localizada nas gotículas lipídicas, mais sim na fase aquosa, acarretando uma distribuição do fármaco extremamente rápida (MEHNERT E MADER, 2001). O que torna importante o estudo da quantidade de fármaco que está encapsulado.

A EE é a quantidade de fármaco incorporado no sistema, em relação à quantidade total do ativo inicialmente adicionado ao sistema.

A ultrafiltração-centrifugação é uma boa técnica para separação das frações encapsulada e livre do fármaco em sistema nanoemulsionado. As gotículas com o fármaco encapsulado permanecem na parte superior de tubos de centrifuga equipados com sistema filtrante enquanto a fase aquosa com fármaco livre move-se para a parte inferior. Em seguida, a quantificação do fármaco livre pode ser estimada, entre outros aparelhos, como cromatografia líquida de alta eficiência (PULGLIA *et al.*, 2008).

Conforme Nemen e Lemos-Senna (2011) e Müller e Colaboradores (2004), a quantificação do fármaco pode ser feita após solubilização do sistema nanoemulsionado em metanol, seguida de centrifugação, coleta e doseamento do sobrenadante.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Obter e caracterizar nanoemulsão O/A contendo óleo de açaí, como fase lipofílica, para aplicação tópica.

#### **3.2 Específicos**

- Caracterizar o óleo de açaí quanto aos parâmetros físico-químicos e seu perfil de ácidos graxos.
- Avaliar a compatibilidade das misturas binárias dos componentes da formulação por análise térmica;
- Obter nanoemulsões fazendo uso do método da temperatura de inversão de fases;
- Desenvolver metodologia analítica de por Cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do cetoconazol na nanoemulsão.
- Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho das gotículas, índice de polidispersidade, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Matérias-primas

O óleo de açaí, lote 04134410R, foi adquirido da empresa Beraca Sabará (Santa Bárbara do Oeste, São Paulo). Foi adquirido 500 g de óleo, este foi fracionado em frascos âmbar em quantidades de 150 mL e hermeticamente fechados e armazenados sob atmosfera inerte de nitrogênio sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .



Figura 8 Imagem do óleo de açaí.

Os tensoativos testados nas formulações foram: o Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (CAS: 68439-49-6, lote 0808288), INCI: CETEARETH 20, conhecido comercialmente como Brij<sup>TM</sup> CS20, com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 15,7; e o Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado (CAS: 61788-85-0, lote 0712788), INCI: PEG 40 hydrogenated castor oil, conhecido comercialmente como Croduret<sup>TM</sup> 50, lote 0836015, EHL 14,1. Estes tensoativos foram gentilmente cedidos pela Croda do Brasil<sup>®</sup> Ltda (São Paulo, SP).

O Cetoconazol foi fornecido pela Natural Pharma, São Paulo, Brasil, lote 002082, – utilizado como fármaco modelo, e o Cetoconazol SQR, lote 1033, cedido

pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, sendo coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

#### 4.1.2 Reagentes e Soluções

Água ultrapura; Metanol grau CLAE-J.T.Baker<sup>®</sup>(CH<sub>3</sub>OH, CAS: 67-56-1, lote: K46C23); Clorofórmio – Synth<sup>®</sup>; (CHCl<sub>3</sub>, CAS: 67-66-3, lote:147115); Éter etílico (R) – Fornecedor: Labsynth<sup>®</sup>; Solução de fenoltaleína (SI); Brometo de potássio (KBr); Acetato de etila P.A.; Acetonitrila P.A. HPLC.

#### 4.1.3 Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu) modelo AY220, n. De série D309200050; placa agitadora com aquecimento (Fisatom) Mod 752A; banho-maria (Quimis), centrífuga (Centribio); banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner (Kondentech); vortex Mixer (Vixar); estufa 502 (Fanem); refratômetro de Abbé (marca Jena), acoplado a um banho térmico (Thermo Haake); agitador magnético (MAG-MULTI Marte); Zeta ziser Nano Series (Malven, Reino Unido); Cromatógrafo Líquido com detector Water 2998 Photodiode Array Detector; cromatógrafo à gás Varian modelo CP 3380, equipado com um detector de ionização de chama Varian Inc., EUA); espectrofotômetro com transformador de Fourier (Shimadzu Corporation IR Prestige 21 Cat. No. 206-73600-36- Kyoto-Japan); Microscópio eletrônico de transmissão (MET); Rancimat 743 Metrohm (Herissau/Suíça); e analisador térmico TGA-50/50H e DSC-60 (Shimadzu<sup>®</sup>).

## **4.2 Métodos**

As análises de caracterização clássicas do óleo, bem como a caracterização das nanoemulsões foram realizadas nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) Medicamento e Cosmético, Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia. A estabilidade oxidativa por Rancimat realizada no Laboratório de Oleoquímica da UFPA. A análise de Cromatografia a gás foi realizada no Laboratório de Medidas Físicas da UFPA. A análise morfológica foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer na UFRJ.

### **4.2.1 Caracterização do óleo de açaí**

Para avaliar a identidade e qualidade do óleo de açaí, foram realizados testes clássicos como ensaios de índice de acidez, de iodo, saponificação, densidade e refração, como também testes mais precisos como análise do perfil lipídico por cromatografia gasosa, a estabilidade oxidativa, análise de espectroscópica na região do infravermelho (FT-IR) e análise térmica.

#### **4.2.1.1 Índice de acidez**

O índice de acidez do óleo de açaí foi determinado segundo o protocolo da American Oil Chemists Society AOCS Cd3d-63.

A realização do procedimento consistiu em pesar 0,2g da amostra em um frasco erlenmeyer de 125mL e adicionar, com auxílio de uma proveta, 50mL de solução éter etílico:etanol etílico 96% (1:1) v/v. A mistura de solventes foi previamente neutralizada com KOH 0,1 N e em seguida foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína como indicador. A solução foi titulada com KOH 0,1N até a observação da coloração rósea pálida que persistiu por aproximadamente 30 segundos.

O índice de acidez foi determinado após aplicação dos dados encontrados na Equação 2.

$$IA = 5,61n/m \quad \text{Equação 2}$$

Onde IA é o índice de acidez (mg KOH/g),  $n$  é o volume (em mL) de hidróxido de potássio 0,1N gasto na titulação e  $m$  é a massa da amostra.

#### 4.2.1.2 Índice de saponificação e Índice de iodo (método indireto)

A determinação do índice de saponificação, assim como o índice de iodo, foi determinado pelo perfil de ácidos graxos obtidos a partir da análise por cromatografia em fase gasosa, segundo a prática AOCS Cd 1c- 85 e AOCS Cd 3a-94, respectivamente (American Oil Chemists Society, 1995). Os métodos descrevem as Equações 3 e 4 para predição do índice de saponificação e de iodo respectivamente:

$$I.S._{mistura} = \frac{3 \times 56,1 \times 1000}{PM \times 3 + 92,09 - (3 \times 18)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$I.S._{mistura}$  = Índice de Saponificação da mistura de ácidos graxos;

PM= peso molécula (ou massa molar) médio dos ácidos graxos (g/mol);

3= número de ácidos graxos por triacilglicerol;

56,1= peso molecular do KOH (g/mol);

1000= conversão de g para mg;

92,09= peso molecular do glicerol (g/mol);

18= peso molecular da água.

$$\begin{aligned} \text{Índice de iodo} = & (\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,950) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,860) + \\ & (\% \text{ ácidolinoleico} \times 1,732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,616) \end{aligned} \quad \text{Equação 4}$$

#### 4.2.1.3 Índice de refração

O ensaio do índice de refração foi realizado em triplicata, empregando um refratômetro de Abbé (marca Jena), acoplado a um banho térmico (Thermo Haake) com temperatura controlada. A leitura foi feita a temperatura de 29,70 °C, conforme o protocolo AOCS Cc7-25.

#### 4.2.1.4 Densidade Relativa

A densidade do óleo de açaí foi determinada pelo método do picnômetro de vidro, à temperatura de 24 °C, de acordo com a metodologia da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

A análise foi realizada com picnômetros de vidro de 5 mL com juntas esmerilhadas. Os picnômetros limpos e secos foram calibrados e preenchidos com água recém-destilada. Em seguida o óleo foi adicionado cuidadosamente pela parede para prevenir formação de bolhas de ar, quando necessário foi removido o excesso da amostra da lateral do recipiente e conferido a temperatura. O valor da massa do óleo de açaí foi obtido pela diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa é igual a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas na mesma temperatura.

O ensaio feito em triplicata foi determinado conforme a fórmula equação 5.

$$\text{Densidade relativa a } 25^{\circ}\text{C} = A - B/C,$$

**Equação 5**

Onde, A é a massa do picnômetro contendo óleo; B é a massa do picnômetro vazio e C é a massa da água à temperatura de 24 °C.

#### **4.2.1.5 Perfil de ácido graxos por Cromatografia Gasosa**

A composição de ácidos graxos do óleo de açaí foi determinada pela derivatização de ácidos graxos em ésteres metílicos, conforme o método proposto por Rodrigues e colaboradores (2010). Os derivados foram isolados via saponificação e esterificação com KOH em metanol (0,1 mol/L) e HCl em metanol (0,12 mol/L). Em seguida, foram extraídos por hexano e injetados no cromatógrafo à gás (Varian modelo CP 3380), equipado com um detector de ionização de chama (no inglês, *Flame Ionization Detection* – FID) e com uma coluna capilar CP-Sil 88 (comprimento 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura 0,25 mm; Varian Inc., EUA). As condições cromatográficas foram: hélio como gás de arraste com vazão de 0,9 mL/min; um detector de ionização de chamas a 250 °C, um injetor (split razão de 1:100) mantido a temperatura de 250 °C e um volume de injeção de 1 µL. A coluna foi submetida a uma rampa de aquecimento de 80 °C a 205 °C, com um aumento subsequente de 4 °C/min. Os picos de ácidos graxos individuais foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de misturas conhecidas de padrão de ácidos graxos (74X Nu-check-prep, Inc., EUA), executados sob as mesmas condições operacionais. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa do total de ácidos graxos.

#### **4.2.1.6 Espectrometria na região do Infravermelho (IV)**

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho do óleo de açaí foi efetuada em um espectrofotômetro com transformador de Fourier (Shimadzu Corporation IR Prestige 21 Cat. No. 206-73600-36- Kyoto-Japan) utilizando discos

de Brometo de Potássio (KBr) na região espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , descrita por Costa e Colaboradores (2013).

#### **4.2.1.7 Estabilidade oxidativa do óleo do açaí – Rancimat**

O índice de estabilidade oxidativa (OSI) foi avaliado pelo equipamento Rancimat 743 Metrohm (Herissau/Suíça) a 100 °C, sob fluxo de ar de 20 L/h, utilizando-se amostras de 5 g de óleo, seguindo o método AOCS Official Method Cd 12b-92.

#### **4.2.1.8 Análise térmica do óleo de açaí**

O óleo de açaí foi submetido as análises de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (em inglês, *diferencial exploratory calorimetry* - DSC), onde a TG foi realizada em um analisador térmico Shimadzu® (modelo TGA: 50/50H) e o DSC foi realizado em um Shimadzu® DSC plus 60.

As amostras foram pesadas de 5 a 10 mg, adicionadas em cadinhos de platina e as análises foram executadas nas seguintes condições: atmosfera de nitrogênio e de ar sintético (50 mL/ min) e razão de aquecimento de 10 °C/min numa faixa de temperatura de 25 a 550 °C. Os cálculos de perda de massa e variação de entalpia foram realizados com auxílio do programa TA 60w Shimadzu® (NUNES et al., 2009; COSTA et al., 2013). As análises de DSC foram realizadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados.

#### **4.2.2 Estudos de pré-formulação**

A caracterização do fármaco, dos tensoativos e de suas misturas binárias com o óleo de açaí, foi realizada por calorimetria exploratória diferencial. As análises

térmicas seguiram as mesmas condições relatadas nos itens 4.2.1.8 (SILVA JUNIOR, 2000; COSTA *et al.*, 2013).

Foram preparadas amostras de 1g das seguintes misturas binárias: óleo e cetoconazol (1:2); óleo e Brij<sup>TM</sup> CS20 (2:1); óleo e Croduret<sup>TM</sup> 50 (1:1), sendo as duas últimas misturas aquecida para melhor homogeneização e transferidas 5 mg para cadinhos de alumínio. Procedeu-se as análises por DSC numa faixa de temperatura de 25 a 300 °C.

#### 4.2.3 Método de preparo das formulações

O preparo das nanoemulsões foi realizado seguindo o método de temperatura de inversão de fase (FERNANDEZ, 2004; SÓLANS, 2005; MONGE-FUENTES, 2014). A fase oleosa, formada do óleo de açaí e o tensoativo, foi pesada separadamente da fase aquosa (água destilada) (Tabela 1). A fase oleosa foi submetida a agitação (600 rpm) por agitador magnético e leve aquecimento por 5 minutos. Após este tempo, foi adicionada a fase aquosa sob agitação e aquecida até a temperatura de 80 °C. Subsequentemente a formulação foi submetida a resfriamento rápido até aproximadamente 25 °C por banho de água fria.

Baseado nos estudos realizados por Monge-Fuentes (2014), foram testadas 4 formulações de cada tensoativo, utilizando diferentes concentrações desses surfactantes assim definidas (óleo:tensoativos) - 1:3; 1:3,5; 1:4; 1:4,5, onde a concentração do óleo permaneceu estável e as concentrações dos tensoativos variaram (7, 8, 9 e 10%, respectivamente). Este teste teve como objetivo avaliar a influência do tensoativos no tamanho das gotículas, e assim, selecionar a preparação de menor tamanho para continuação do estudo.

Tabela 1 Concentrações dos constituintes para o preparo das nanoemulsões.

Óleo:Tensoativos	Óleo de açaí	Tensoativo	Fase aquosa
1:3	2%	7%	q.s.p. 11 mL
1:3,5	2%	8%	q.s.p. 11 mL
1:4	2%	9%	q.s.p. 11 mL
1:4,5	2%	10%	q.s.p. 11 mL

#### **4.2.3.1 Incorporação do fármaco cetoconazol**

As nanoemulsões selecionadas após estudo feito no item 4.2.3.1, foram testadas quanto a adição do cetoconazol nas concentrações de 0,5% e 1%. O preparo foi realizado pelo método da temperatura de inversão de fase, conforme o item 4.2.3, com adição do cetoconazol na fase oleosa.

#### **4.2.3.2 Estudos de estabilidade dos sistemas nanoemulsionados**

A estabilidade física das NE foi acompanhada avaliando-se o tamanho de gotícula, o índice de polidispersividade e o potencial zeta das formulações, por período de 30 dias. Para realizar a análise, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:100) nos tempos 1, 15 e 30 dias.

#### **4.2.4 Validação Analítica para Doseamento de Cetoconazol a partir das NE por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

Tendo em vista que a determinação da eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *ex vivo* na NE estão entre os objetivos deste trabalho, tornou-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica sensível e reprodutível para o doseamento do cetoconazol a partir de sistema nanoemulsionados.

A validação analítica foi executada para garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e segurança dos resultados obtidos (ANVISA, 2003).

A validação da metodologia analítica seguiu critérios determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução de n. 899 de 20 de maio de 2003 e os parâmetros analisados foram especificidade,

linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação. A detecção e quantificação do Cetoconazol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV em arranjo de diodo (CLAE/DAD), segundo ANVISA (2003).

#### **4.2.4.1 Condições cromatográficas**

A quantificação do cetoconazol a partir de NE foi realizada por CLAE utilizando os seguintes parâmetros: Cromatógrafo Waters Alliance e 2695 equipado com um detector Waters 2998, e com uma coluna capilar X Bridge™ C18 5 µm 4.6X20mm GuardCartridge (2PK). As fases móveis foram compostas de Trietanolamina:Metanol (1:500) e Acetato de Amônio:Água ultrapura (1:200) – (75:25, v/v) – onde a Trietanolamina:Metanol foram filtradas em filtro de nylon 66 membranas (0,45 µm x 47 mm) e a Acetato de Amônio:Água foram filtradas com filtro de membrana HÁ em ésteres de celulose (NTR ATO 75-80%) 0,45 micra, 47 mm branca lisa da marca Milipore. As demais condições cromatográficas foram: fluxo de 1,23 mL/min, um volume de injeção de 10 µL. A detecção foi programada para 244 λ.

#### **4.2.4.2 Preparação da solução-mãe e suas diluições**

A solução-mãe (SM) foi feita com o cetoconazol (SQR). Pesou-se 0,0030 g de cetoconazol em um balão de 100 mL e o volume foi completado com metanol, a fim de obter concentrações de 30 µg/mL. Esta solução foi diluída para obtenção de 6 soluções com diluições seriadas na faixa de concentração 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg/mL.

#### 4.2.4.3 Especificidade

A especificidade do método foi determinada por comparação entre os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas do cetoconazol (SQR) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL, com o cetoconazol (fornecido pela Natural Pharma) em metanol na concentração de 6,0 µg/mL e do filtrado de Nanoemulsão (fórmula B10 com Cetoconazol a 0,5%).

#### 4.2.4.4 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção da curva analítica na concentração de 1,0 a 10,0 µg/mL de solução de cetoconazol. Para isso, foi utilizado a SM com 0,0030 g de padrão e suas diluições seriadas na faixa de concentração 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg/mL. As soluções foram filtradas sobre membrana de Milipore® 0,45 µm e 10µL foram injetadas no cromatógrafo. Cada solução foi injetada no cromatógrafo em triplicata e em 3 dias diferentes. A curva média foi plotada um gráfico de dispersão relacionando a média das áreas dos picos formados nos cromatogramas e suas respectivas concentrações. O estudo da regressão linear foi realizado para obter a equação da reta entre as concentrações de cetoconazol e as alturas dos picos correspondentes, expressa por  $y = a + bx$ . O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) não pode ser menor que 0,99 (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

#### 4.2.4.5 Precisão intermediária e Repetibilidade

Para medir essa precisão foi utilizado as concentrações de 2, 6 e 10 µg/mL quantificadas em triplicata, a cada dia e realizando a comparação entre a

quantificação das mesmas concentrações em dois dias. Foi avaliado o coeficiente de variação e esse não deve ser maior que 5%.

O ensaio de repetibilidade foi realizado em um dia, com o mesmo analista, analisado uma amostra na concentração de 6,0 µg/mL em seis vezes e o resultado foi expresso como coeficiente de variação que não pode ser maior que 5%.

Ambos os testes, foram calculados através da Equação 6.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

**Equação 6**

#### 4.2.4.6 Exatidão

O teste de recuperação foi realizado para avaliar a exatidão do método, o qual foi analisado nas concentrações 2,0, 6,0 e 10,0 µg/mL em triplicata. Embora a legislação não recomende valores de desvios permitidos para este teste, admite-se o mesmo valor limite aplicado para precisão, ou seja, não pode ser maior que 5%. Os limites de recuperação não devem ser inferiores a 80% e superiores a 120% (RIBANI et al., 2004)

A exatidão foi calculada pela Equação:

$$R (\%) = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

**Equação 7**

#### 4.2.4.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente a partir da relação entre a curva de calibração de cetoconazol e sua inclinação, utilizando o fator multiplicador indicado pela norma ICH (1996), nas Equações 8 e 9, respectivamente.

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

**Equação 8**

Onde: LD: Limite de detecção

DP: Desvio padrão da reta de calibração;

IC: Inclinação da curva de calibração.

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10$$

**Equação 9**

Onde: LQ: Limite de detecção

DP: Desvio padrão da reta de calibração;

IC: Inclinação da curva de calibração.

#### **4.2.5 Morfologia**

A morfologia foi feita em microscópio eletrônico de transmissão (MET), modelo Zeiss 900. Inicialmente foi preparada uma diluição aquosa de NE, na razão de 1:100 em água destilada. Uma gota da amostra diluída foi colocada em uma grade de cobre com malhas de 400 mesh por unidade. Após 30 segundos, o excesso foi retirado em filme contínuo utilizando papel filtro. Em seguida, foi adicionada uma gota de ácido fosfotungstico a 2% e novamente após 30 segundos foram secas em filme contínuo utilizando papel filtro.

#### **4.2.6 Eficiência de Encapsulação**

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada medindo-se a concentração livre do fármaco na fase aquosa. A fração livre foi separada após

filtração da amostra, seguida de solubilização em metanol e centrifugação para separação das gotículas do meio aquoso. Frações dos sobrenadantes foram coletadas e quantificadas por CLAE conforme item 4.2.4.1. Em cada sistema filtrante, foi adicionado 1 mL da NE diluída. As unidades foram centrifugadas a 4.000 rpm por 60 minutos em uma centrífuga Centribio. A análise foi feita em triplicata. Por fim, a EE em porcentagem foi calculada pela relação entre o total da substância ativa encapsulada e total da substância ativa na formulação.

$$EE \% = \frac{\text{Total do ativo encapsulado}}{\text{Total do ativo adicionado na formulação}} \times 100 \quad \textbf{Equação 10}$$

#### **4.2.7 Análise de dados**

A média e o desvio padrão da média (DP) foram calculados no programa Excel 2010.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do óleo de açaí

As características físico-químicas dos óleos vegetais são dependentes de sua constituição graxa, sendo necessário a realização de testes físico-químicos para se ter conhecimento desta. Variados testes foram utilizados para se obter importantes dados da natureza do óleo de açaí, assim como, para o controle de qualidade, uma vez que estes são necessários que se possa conferir a degradação ou falsificação (GUNGSTONE, 2004).

#### 5.1.1 Índice de acidez, iodo, saponificação, refração e densidade

A Tabela 1 mostra as características físico-química do óleo de açaí analisado.

Tabela 2 Características físico-químicas do óleo de açaí.

Parâmetros	Resultados
Organoléptica	Verde escuro
Índice de acidez	3,66 mg KOH/g
Índice de saponificação	199 mg KOH/ g
Índice de iodo	77,0 g I <sub>2</sub> /100g
Índice de refração (25 <sup>o</sup> C)	1,470
Densidade relativa	0,950 g/mL

A cor descrita acima, verde escura, encontra-se de acordo com a coloração encontrada por Pacheco-Palencia e Colaboradores (2008) e Silva e Rogez (2013).

A acidez de um óleo provém da reação hidrolítica dos triacilgliceróis, sendo uma variável relacionada à natureza e qualidade da matéria-prima, ao seu processamento e às condições de conservação (MORETTO e FETT, 1998). Um

elevado índice de acidez pode ser sugestivo de processamento insatisfatório, estocagem inadequada, manuseio impróprio, entre outros (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A ocorrência elevada de ácidos graxos livres ocasionado por reações hidrolíticas resulta em mudanças sensoriais no óleo, como diferenças na cor e no odor, e conseqüentemente nos produtos derivados deste óleo (FERREIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; NEDHI, 2013; WALIA *et al.*, 2014).

Segundo a RDC 270 da ANVISA (2005), o índice de acidez recomendado é no máximo de 4 mg KOH/g para óleos vegetais. Após análise, o óleo de açaí apresentou índice de acidez igual a 3,66 mg de KOH/g (Tabela 1). Desta forma, o valor encontrado foi dentro dos limites recomendado pela ANVISA.

O resultado do índice de acidez é um ensaio que pode variar conforme a temperatura, ar atmosférico, luz e amadurecimento do fruto. Armazenar o óleo de maneira correta evita a ação desses fatores e, conseqüentemente, evita a sua deterioração, aumentando a vida de prateleira do produto (MORETTO e FETT, 1998).

A reação de saponificação, conforme Ribeiro e Seravalli (2004), pode estabelecer o grau de deteriorização e da estabilidade, verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e indentificar possíveis fraudes e adulterações com substâncias insaponificáveis como óleo mineral.

O valor do índice de saponificação observado na amostra do óleo de açaí (199 mg KOH/g), Tabela 1, está similar aos encontrados por Silva e colaboradores (2009) e Walia e colaboradores (2014) descreveram índices de saponificação de de 192,88 mg KOH/g no óleo de butiti e 188,98 mg KOH/g no óleos de girassol, e, respectivamente. Tendo em vista o resultado encontrado, conforme Ribeiro e Seravalli (2004), o óleo de açaí não apresenta evidências de fraude ou adulteração.

O índice de iodo constitui medida quantitativa do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais. É um parâmetro geralmente descrito como uma faixa de valor, ao invés de um número fixo, porque o grau de insaturação pode variar em função da sazonalidade ou de diferentes processamentos. O valor encontrado na determinação é sugestivo do grau de pureza do material ensaiado bem como da presença de adulterantes (MAIA, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; WALIA *et al.*, 2014).

O óleo de açaí, em razão do maior teor de ácido graxos insaturados encontrados, apresentou seu valor de índice de iodo de 71  $\text{gl}^2/100\text{g}$ . Valores

aproximados foram encontrados em óleos de composição similares, como o óleo de buriti (74,64 g<sup>l</sup>/100g) (SILVA *et al.*, 2009) e nos óleos extraídos da polpa de macaúba (76 g<sup>l</sup>/100g) e do caroço do bacuri (74,04 g<sup>l</sup>/100g) (COIMBRA e JORGE, 2011).

O valor do índice de refração encontrado foi de 1,470, compatível aos resultados encontrados em óleo de açaí por Pacheco-Palencia *et al.* (2008) e Silva e Rogez (2013), 1,468 e 1,48, respectivamente. Costa e Colaboradores (2004) encontraram uma variação do índice, em média, de 1,4470 – 1,4780 em óleo de mamona e Pons (2005) encontrou o valor de 1,479. Coimbra e Jorge (2011), em óleo extraído da polpa de macaúba obtiveram 1,4556.

O índice de refração, nos óleos, é muito usado como critério de qualidade no controle de processos de hidrogenação de óleos insaturados e identidade (CECCHI, 2003). Portanto, o valor do índice de refração encontrado no óleo de açaí está dentro do padrão de qualidade.

Conforme Moretto e Fett (1998) e Walia e Colaboradores (2014), a densidade é influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos graxos, quanto menor for seu peso molecular mais alto será o seu grau de insaturação.

O valor da densidade encontrado do óleo de açaí foi de 0,950 g/mL. Esse valor é semelhante aos encontrados em óleo de açaí por Pacheco-Palencia e colaboradores (2008) e Silva e Rogez (2013), 0,924 g/mL e 0,893 g/mL, respectivamente, o que sugere que os óleos possuem quantidades similares de ácidos graxos insaturados.

### **5.1.2 Estabilidade Oxidativa - Rancimat**

Para se verificar a estabilidade dos óleos ou sua suscetibilidade à oxidação, a amostra foi submetida ao teste de oxidação acelerada por alta temperatura e aeração (ANTONIASSI, 2001, OETTERER *et al.*, 2006), tendo em vista a deteriorização lipídica ou a oxidação dos óleos vegetais podem ser causadas por fatores, como o grau de insaturação, a luz, a temperatura, entre outros (LEONARDIS e MACCIOLA, 2012).

O teste fornece o índice de estabilidade oxidativa de óleos vegetais através do aumento da condutividade elétrica desenvolvida. No aparelho realizado, o fluxo de ar passa através do óleo mantido sob aquecimento, em temperatura que varia de 100 a 140 °C, gerando do processo de oxidação lipídica e arrastando os ácidos carboxílicos voláteis (principalmente ácido fórmico). Depois o ar borbulha em água deionizada onde os produtos arrastados solubilizam causando o aumento da condutividade elétrica da água (ANTONIASSI, 2001; OETTERER *et al.*, 2006).

A análise apresentou a curva de condutividade ( $\mu\text{s}$ ) vs tempo (Figura 09), onde mostra um ponto que corresponde ao índice de estabilidade oxidativa ou o período de indução de 11,79 h. Souza e Colaboradores (2007) e Costa e Colaboradores (2013) relataram valores aproximados com óleo de macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) (13,7 a 37 h) e óleo de pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) (8,52 – 10,32h), respectivamente.

A autoxidação ocorre entre as ligações insaturadas, portanto, espera-se que óleos que contenham quantidades de ácidos graxos insaturados aproximadas, apresentem valores similares do tempo de indução, conforme ocorreu com o óleos de açaí quando comparado macadâmia (SOUZA *et al.*, 2007) e o óleo de *Pentaclethra macroloba* (COSTA *et al.*, 2013).

A diferença dos valores pode ser justificada pela diferença da composição química dos óleos vegetais, os quais influenciam a estabilidade oxidativa.

A Resolução da ANP No.14/2012, sugere que o tempo de indução aceitável deve ser de no mínimo 6 horas. Antoniassi (2001) relata que abaixo desse tempo praticamente não existe formação de compostos provenientes da oxidação, enquanto que acima do mesmo ocorre rápido aumento da taxa de oxidação e formação de voláteis. Ou seja, óleos vegetais quando acometidos por maior oxidação apresentam diminuição do tempo de indução e do tempo de prateleira, assim como os produtos derivados.

Assim, o resultado do Rancimat mostrou que em condições extremas de temperatura, exposição a umidade e ar atmosférico o óleo de açaí ainda conseguiu manter-se estável durante 11,79 horas.

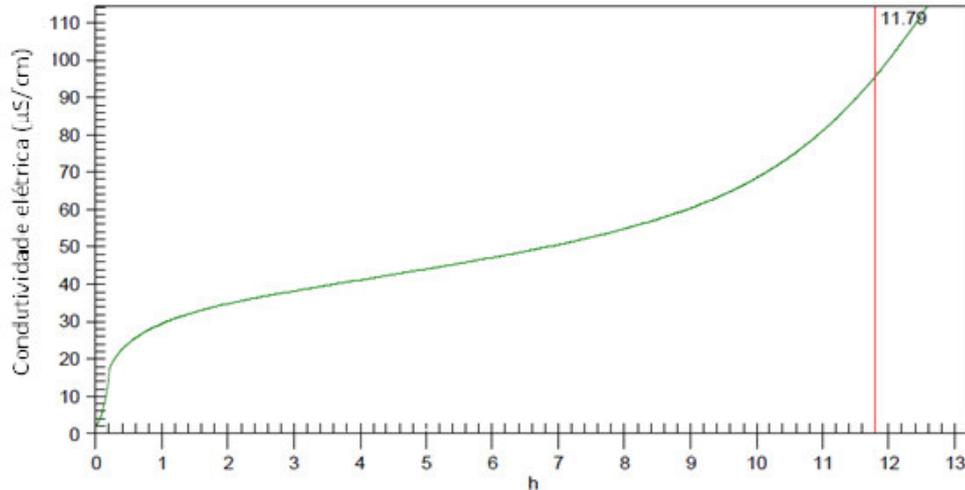


Figura 9 Curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) versus tempo (Rancimat) do óleo de açaí apresentando um tempo de indução de 11,79 horas.

### 5.1.3 Perfil de Ácidos Graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos pode ser considerada como um parâmetro indispensável de autenticidade do óleo vegetal e este procedimento é geralmente realizado por meio de cromatografia gasosa (CG) (GUNGSTONE, 2004). Através desse estudo, podem ser identificadas alterações na composição química do óleo vegetal que são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura do triacilglicerol (MORETTO e FETT, 1998).

O cromatograma ilustrado na Figura 10, expressa o perfil dos ácidos graxos do óleo de açaí. Na Tabela 3 pode ser verificada a composição percentual dos ácidos graxos saturados e insaturados encontrados na amostra.

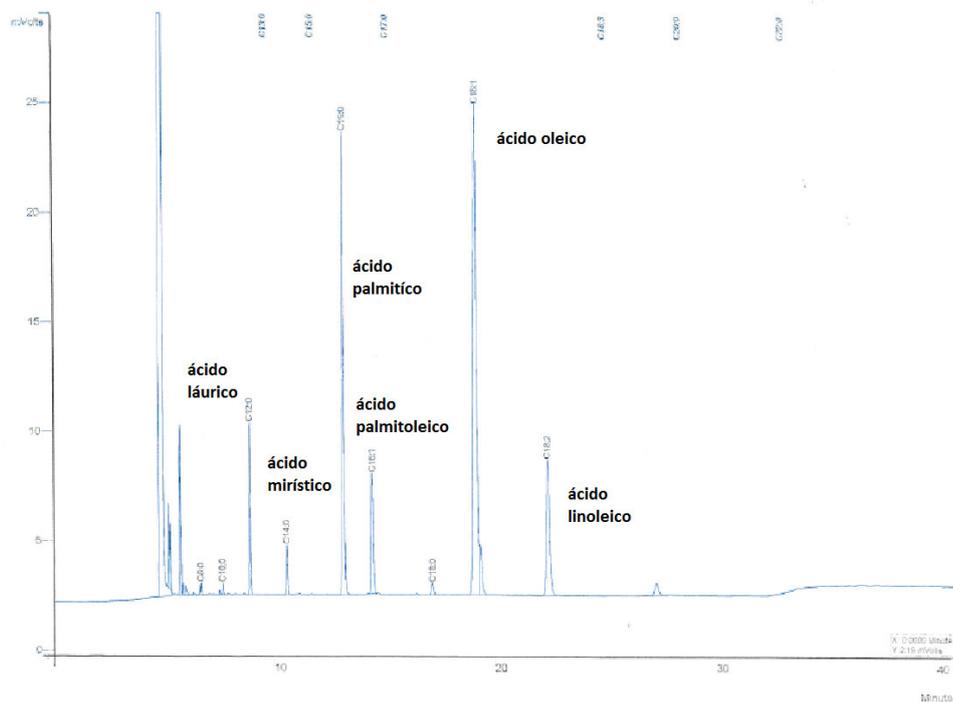


Figura 10 Cromatograma obtido do óleo de açai por CG acoplado ao detector de ionização de chamas.

O resultado mostrou que o óleo de açai é constituído principalmente pelos ácidos graxos insaturados (68,05 %), sendo o componente majoritário o Ácido oleico (47,58 %), seguido do Ácido linoleico (13,53 %) e do Ácido palmitoleico (6,94 %). Também foi possível verificar a presença de 31,88 % de ácidos graxos saturados, sendo o Ácido palmítico (24,06 %) o prioritário. Estes valores estão de acordo a composição do óleo de açai encontrada em estudos, constando em suas análises cerca de 70 % de ácidos graxos insaturados, sendo estes representados principalmente Ácido oleico, seguido pelo Ácido palmítico (22 %), Ácido linoleico (8,4 %), Ácido palmitoleico (3,4 %) (MANTOVANI *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2008; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008; SILVA e ROGEZ, 2013).

A composição do óleo de açai permitiu compara-lo ao perfil de ácidos graxos dos óleos de oliva e de abacate, dois óleos vegetais de alto valor no mercado muito utilizados na indústria de alimentos e de cosméticos (ROGEZ, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2008; SILVA e ROGEZ, 2013). Os resultados expressos na Tabela 3 corroboram com essa afirmativa.

Tabela 3 Composição percentual de ácidos graxos do óleo de açaí por cromatografia gasosa.

Composição	Porcentagem em massa (%)		
	Óleo de açaí	Óleo de oliva*	Óleo de abacate**
<b>Ácido oleico 18:1</b>	47,53	55,5 – 83	45,7
<b>Ácido linoleico 18:2</b>	13,58	3,5 – 21	15,4
<b>Ácido palmitoleico 16:1</b>	6,94	0,3 - 3,5	9,1
<b>Ácido palmítico 16:0</b>	24,06	7,5 – 20	28,1
<b>Ácido mirístico 14:0</b>	1,75	-	-
<b>Ácido láurico 12:0</b>	4,77	-	-
<b>Outros</b>	1,36	-	-

\*Brasil (1999) \*\* Rogez (2000)

As diferenças na composição do óleo açaí podem ser explicadas por ele ser um produto de origem natural e sua composição pode variar conforme a época de colheita, além do método de extração e conservação (NASCIMENTO *et al.*, 2008) e com o local da coleta (KUNLE *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos, oleico e linoleico, trazem vantagens para o uso do óleo de açaí quando aplicados em produtos de uso tópico. Estudo realizados por LEE *et al.* (1986) relatam que o Ácido oleico, principal ácido graxo insaturado constituinte do óleo do açaí, pertence à classe dos lipídios vitais na construção da membrana celular. Esse lipídio está presente na epiderme e tem a função de proteger e fazer a barreira da pele evitando a desidratação por perda de água transepidermica. Lowe e Colaboradores (1998) relataram que o ácido linoleico pode restaurar a pele humana de vários distúrbios dermatológicos em cinco dias quando aplicado por via tópica.

O palmítico, segundo Rowe, Sheskey e Quinn (2009), é utilizado como agente emulsificante e/ou promotor de penetração cutânea em formulações tópicas. Baseado nisso, é possível dizer que o óleo de açaí pode ser aplicado na constituição física da nanoemulsão, assim como, ter potenciais benefícios do ponto de vista farmacêutico e cosmético.

#### 5.1.4 Espectrometria na região do Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais de infravermelho, obtidos na região de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , da amostra do óleo de açaí estão ilustrados na Figura 11. Dentre as bandas de absorção apresentadas no espectrograma as principais foram em 3012  $\text{cm}^{-1}$ , 2935  $\text{cm}^{-1}$ , 1750  $\text{cm}^{-1}$ , 1448  $\text{cm}^{-1}$  e 1162  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem aos grupamentos funcionais apresentados na Tabela 4.

A banda em 3012  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento do hidrogênio de carbono insaturado por ligação dupla (C=C-H), de duplas não conjugadas, sugestivo de cadeias insaturadas de ácidos graxos. Essa atribuição é apoiada na banda da deformação C-H fora do plano em 728  $\text{cm}^{-1}$  atribuído à ácidos carboxílicos e na banda 1448  $\text{cm}^{-1}$ , referente à frequência de estiramento de carbono ligados por uma ligação dupla (-CH=CH-) em aromáticos. A ausência de banda intensa proveniente da deformação de C-H na região de 1000 – 800  $\text{cm}^{-1}$  ou vibrações de estiramento em 1680 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ , também pode ser utilizada para evidenciar essa vibração (MEILUNAS, 1990).

A banda 2935  $\text{cm}^{-1}$  é referente à ligação C-H em alcanos e a banda em 3476  $\text{cm}^{-1}$  corresponde as vibrações de grupamentos hidroxilas (SILVERTEIN *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2012; JAVDINIA *et al.*, 2013).

A Figura 15 mostra uma proeminente banda de estiramento de carbonila (C=O) em 1750  $\text{cm}^{-1}$ , presentes em ácidos carboxílicos e ésteres, e vibrações da ligação C-O em 1162  $\text{cm}^{-1}$ , que são diagnósticos para a ligação éster no triacilglicerol, o maior constituinte de um óleo com ácidos graxos de cadeia longa (FONSECA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013).

Nota-se, então, que dados apresentados nos espectros de absorção na região do IV, sugestivos da presença de éster graxo de cadeia insaturada, são compatíveis com o resultado obtido na cromatografia gasosa.

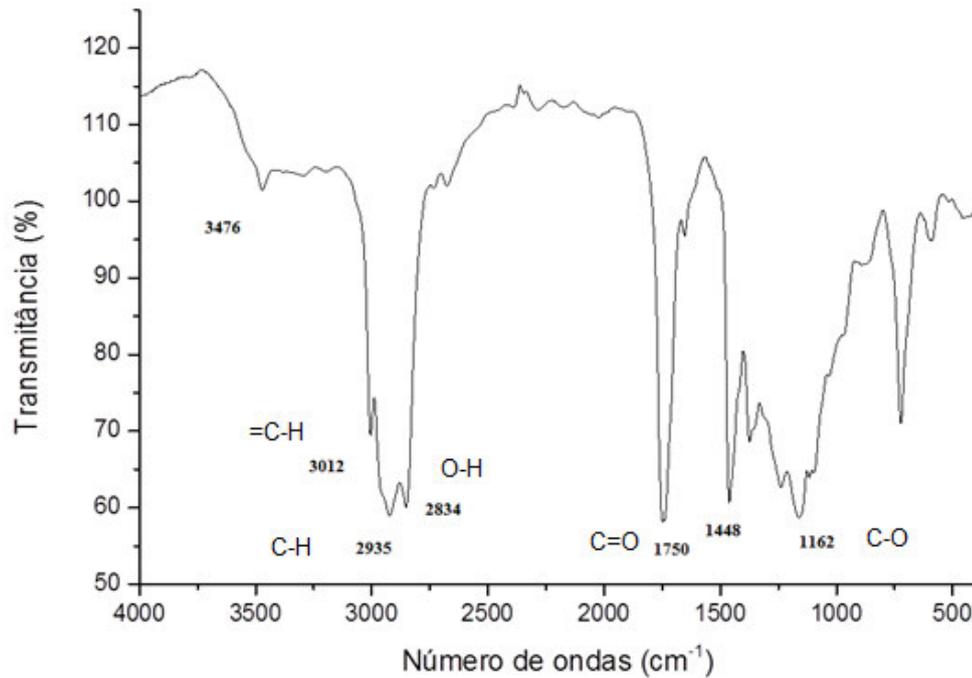


Figura 11 Espectros vibracionais no FT-IR do óleo de açai na região espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 4 Faixa de absorção de ligações moleculares do óleo de açai.

Faixa absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de ligação
3476	OH
3012	=C-H
2935	C-H
2834	O-H
1750	-C=O-
1448	-HC=CH-
1162	C-O

Neste sentido, os resultados apresentados neste teste e nos demais indicam que o óleo de açai não está adulterado e encontra-se em boas condições para uso, assim como apresenta vantagens para ser utilizado no preparo de nanoemulsões de uso tópico.

### 5.1.5 Estabilidade térmica do óleo de açaí

O estudo da estabilidade térmica do óleo de açaí, através da curva TG/DTG do óleo em atmosfera de  $N_2$  (Figura 12) apresentou extrapolação onset de  $392,29^\circ C$  e endset  $433,35^\circ C$ , com 99,580% de perda de massa. Através da curva DTG observamos três picos consecutivos, nas seguintes temperaturas  $401,78^\circ C$ ,  $418,78^\circ C$  e  $428,47^\circ C$  não distinguidos na curva TG. Possivelmente os diferentes eventos ocorrem em consequência, dos diferentes tamanhos e diferentes número de insaturações dos ácidos graxos. O comportamento térmico do óleo de açaí em atmosfera sintético apresentou três eventos sobrepostos, transformando o processo praticamente em um (Figura 12). O evento principal ocorre na temperatura onset de  $384,89^\circ C$  e endset  $443,89^\circ C$ , com 94,431% de perda de massa. A decomposição do óleo ocorre principalmente pela oxidação dos ácidos graxos provocada por temperatura alta, porém quando submetidas a atmosfera normal, além do efeito da temperatura, observa-se a influência do oxigênio sobre a amostra, este reage com os ácidos graxos prolongando o tempo de decomposição (SOLÍS-FUENTES *et al.*, 2010; NEHDI *et al.*, 2012).

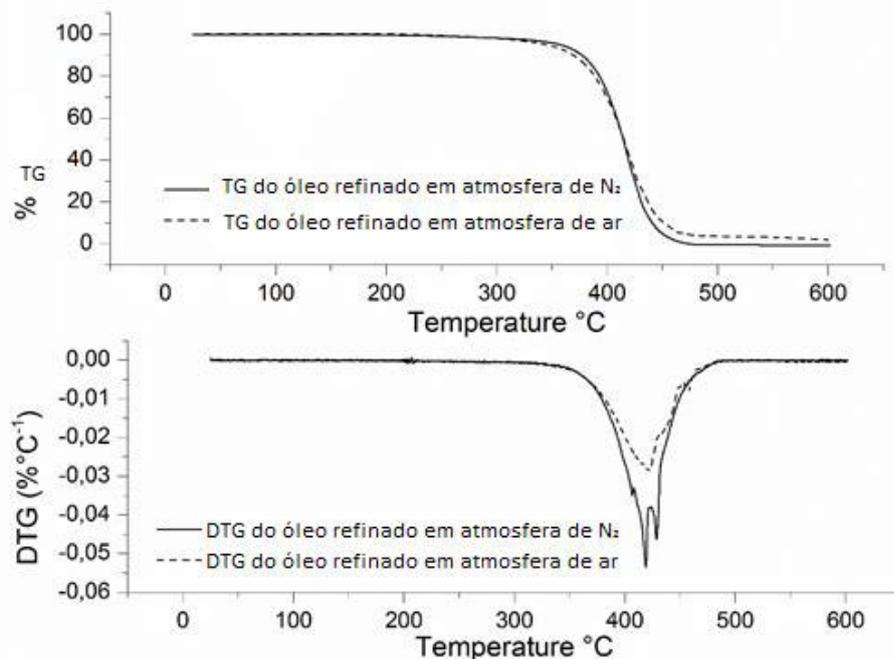


Figura 12 Curva de TG/DTG do óleo de açaí em atmosfera de  $N_2$  e atmosfera sintética (50 mL/min) e razão de aquecimento de  $10^\circ C/min$ , numa faixa de temperatura de 25 a  $600^\circ C$ .

A estabilidade dos ácidos graxos insaturados é menor que dos ácidos graxos saturados. Pressupõem-se então que em temperaturas mais baixas ocorre inicialmente a perda de substâncias voláteis, seguido de ácidos graxos de cadeias curta e insaturados. Assim, pode-se afirmar que ácidos graxos insaturados do óleo de açaí, degradaram em temperaturas menores que o ácido palmítico, mirístico, esteárico e os demais ácidos graxos saturados presentes na amostra. Essa diferença de temperatura de degradação ocorre devido o ponto de ebulição do ácido graxo insaturado ser menor que do ácido graxo saturado (DWECK e SAMPAIO, 2004; SOLÍS-FUENTES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013).

A curva de DSC do óleo (Figura 13) apresenta sete eventos endotérmicos, provavelmente causados por variados pontos de ebulição dos triacilgliceróis que compõem o óleo (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009; COSTA *et al.*, 2013) e pela decomposição destes em virtude da oxidação provocada pela temperatura alta (SOLIS-FUENTES *et al.*, 2010; NEHDI *et al.*, 2013). Os principais eventos registrados apresentaram-se nos seguintes intervalos de temperatura: 320,18 °C a 323,15 °C com entalpia de -2,6 J/g; 369,77 °C a 391,18 °C com entalpia de -59,15 J/g e 393,57 °C a 446,6 °C com entalpia de -8,98 J/g.

Portanto, que de acordo com os resultados apresentados por análises térmicas foi possível ver que a degradação do óleo ocorre acima de 200 °C.

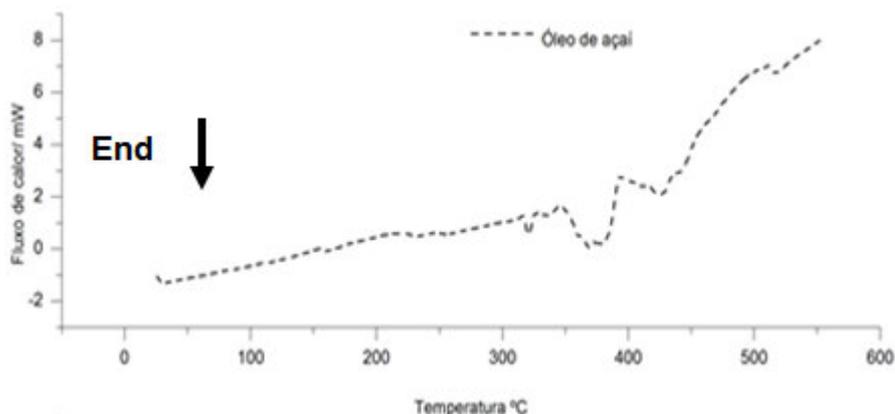


Figura 13 Curva de calorimetria exploratória diferencial do óleo de açaí em atmosfera de N<sub>2</sub> (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de temperatura de 25 a 550 °C.

## 5.2 Ensaio preliminares de avaliação dos componentes da formulação

As análises dos componentes da formulação (o fármaco, os tensoativos e suas misturas binárias com o óleo de açaí) foram realizadas por calorimetria exploratória diferencial.

### 5.2.1 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da utilização das técnicas termoanalíticas é possível caracterizar possíveis incompatibilidades e interações entre os componentes de uma determinada formulação. Para esse estudo foi necessário a análise térmica dos componentes isolados e em misturas binárias.

As curvas DSC do cetoconazol, do óleo de açaí e da mistura binária destes, estão representadas na Figura 13, onde o óleo de açaí até 300 °C não mostrou nenhum evento significativo, e acima de 300 °C apresenta uma série de eventos endotérmicos já explanados no tópico 5.1.5. O cetoconazol mostrou um pico endotérmico de fusão na temperatura de 149,4 °C, com extrapolação onset a 147 °C e entalpia de - 82,4 J/g. Este resultado está de acordo com a faixa de fusão do cetoconazol (148 °C a 152 °C), segundo a Farmacopeia Britânica, 2009. A curva DSC da mistura (óleo de açaí e cetoconazol) apresentou um único evento em onset 143,57 °C e endset 150,68 °C, e a  $\Delta H = -66,25$  J/g. A mistura apresenta variação de entalpia menor do que o material isolado. Supõe-se que isso se deve à presença do lipídio líquido (óleo de açaí), que induz a um menor ordenamento cristalino e dispersa boa parte do cetoconazol da mistura, resultando em menor energia que os cristais desse fármaco precisam para mudar de fase (Figura 14 e Tabela 5).

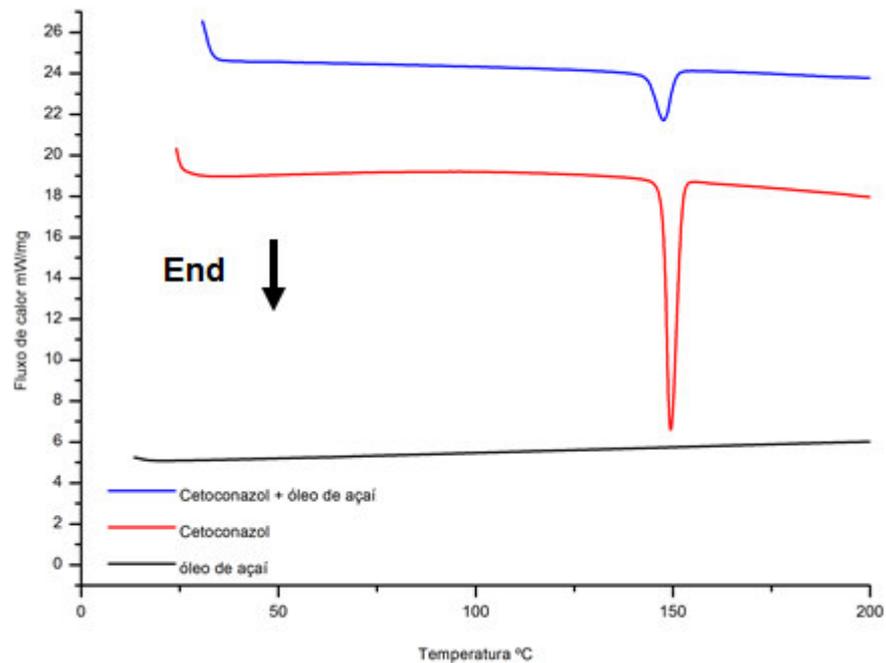


Figura 14 Curva de calorimetria exploratória diferencial do cetoconazol, do óleo de açaí e da mistura óleo de açaí:cetoconazol, em atmosfera de  $N_2$  (50 mL/min), razão de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , numa faixa de temperatura de 25 a  $200\text{ }^\circ\text{C}$ .

A curva de DSC do Brij<sup>TM</sup> CS 20 revela um pico endotérmico (Figura 15 e Tabela 5). Este pico está compreendido no intervalo de temperatura de  $33,83\text{ }^\circ\text{C}$  a  $45,04\text{ }^\circ\text{C}$ , com variação de entalpia de  $-190,86\text{ J/g}$ , este dado está coerente com ponto de fusão ( $44\text{ }^\circ\text{C}$ ) descrito pelo boletim técnico CGDT15 da OXITENO. A mistura do Brij<sup>TM</sup> CS 20 e óleo de açaí revela um pico descendente característico de evento endotérmico. O pico está compreendido no intervalo de temperatura de  $32,51\text{ }^\circ\text{C}$  a  $44,23\text{ }^\circ\text{C}$ , com variação de entalpia de  $-46,83\text{ J/g}$ . A mistura apresenta variação de entalpia menor do que o material isolado. Esse fenômeno pode ser atribuído por uma desorganização da estrutura cristalina do Brij<sup>TM</sup> CS 20 em virtude da mistura deste com o óleo de açaí (LACERDA, CERIZE & RÉ, 2011; SANTOS, et al. 2015).

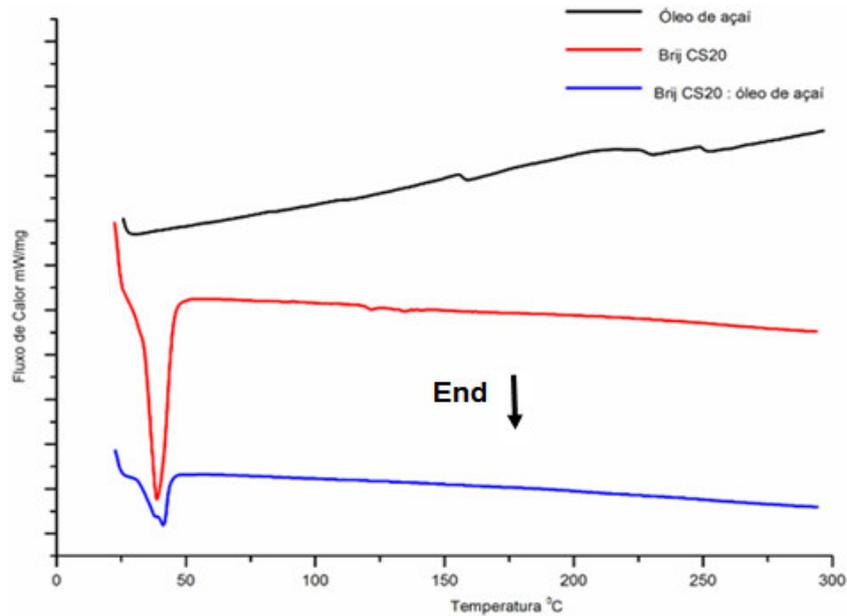


Figura 15 Curva de calorimetria exploratória diferencial do Brij<sup>TM</sup> CS 20, do óleo de açaí e da mistura óleo de açaí:Brij<sup>TM</sup> CS 20, em atmosfera de N<sup>2</sup> (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de temperatura de 25 a 300 °C.

A análise por DSC do Croduret<sup>TM</sup> 50 apresenta três pequenos eventos registrados nos seguintes intervalos de temperatura: onset 128,05 °C a 137,75 °C com variação de entalpia de -18 J/g, onset 147,89 °C a 152,89 °C com variação de entalpia de -3,38 J/g, e onset 157,86 °C a 162,65 °C com variação de entalpia de -3,53 J/g. Já na mistura desse tensoativo com o óleo de açaí foi possível notar que apenas um evento ocorreu no intervalo de temperatura de 38,43 °C a 42,17 °C, com variação de entalpia de -1,67 J/g. Isso provavelmente ocorreu pela presença do lipídio líquido causando desaparecimento dos picos referentes ao Croduret<sup>TM</sup> 50, sugerindo que a dispersão modifica as propriedades físicas do Croduret<sup>TM</sup> 50 e com consequente a mudança para o estado amorfo (Figura 16 e Tabela 5) (SANTOS, *et al.* 2015).

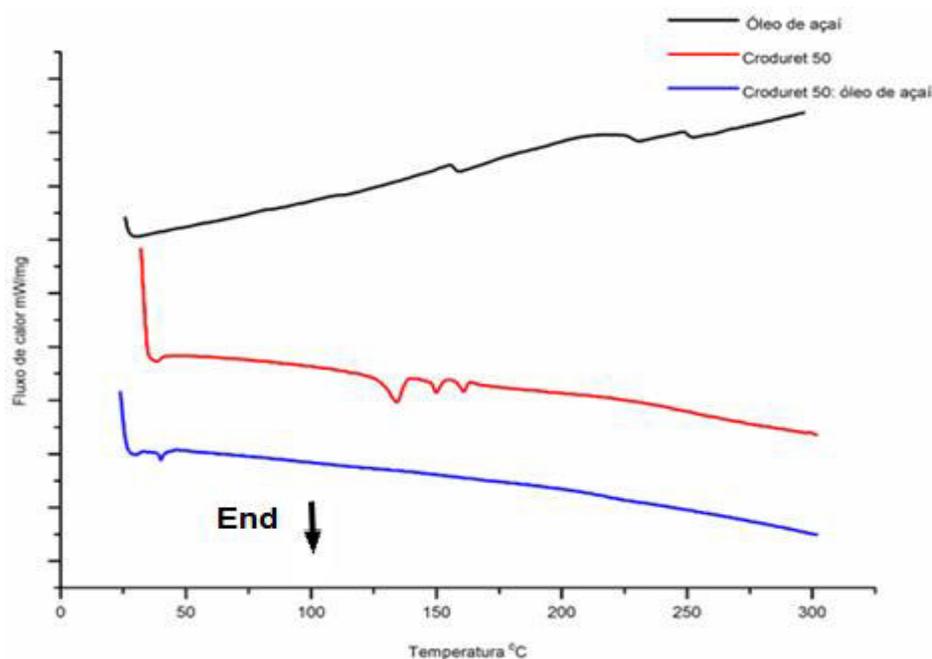


Figura 16 Curva de calorimetria exploratória diferencial do Croduret™ 50, do óleo de açaí e da mistura Croduret™ 50:óleo de açaí, em atmosfera de N<sup>2</sup> (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de temperatura de 25 a 300 °C.

Tabela 5 Dados da calorimetria exploratória diferencial das misturas binárias e dos componentes isolados.

Amostras	Onset	Endset	Entalpia
Cetoconazol	147,0 °C	-	-82,40 J/g
Cetoconazol + OA	143,57 °C	150,68 °C	-66,25 J/g
Brig™ CS 20	33,83 °C	45,04 °C	-190,86 J/g
Brig™ CS 20 + OA	32,51 °C	44,23 °C	-46,83 J/g
Croduret™ 50	128,05 °C	137,75 °C	-18 J/g
	147,89 °C	152,89 °C	-3,38 J/g
	157,86 °C	162,65 °C	-3,53 J/g
Croduret™ 50 + OA	38,43 °C	42,17 °C	-1,67 J/g

AO - Óleo de açaí

Através das análises por DSC do óleo de açaí quando misturado a outros constituintes da formulação; o Brij™ CS20 e cetoconazol, verificou-se que não houve indícios de interações químicas ou físicas que pudessem interferir no prosseguimento do estudo

### 5.3 Validação Analítica para Doseamento de Cetoconazol por CLAE

#### 5.3.1 Especificidade

Os cromatogramas, ilustrados na Figura 21, apresentam as análises realizadas no cetoconazol (SQR) em metanol 6,0  $\mu\text{g/mL}$ , no cetoconazol (utilizado nas formulações) em metanol a 6,0  $\mu\text{g/mL}$  e no filtrado da NE.

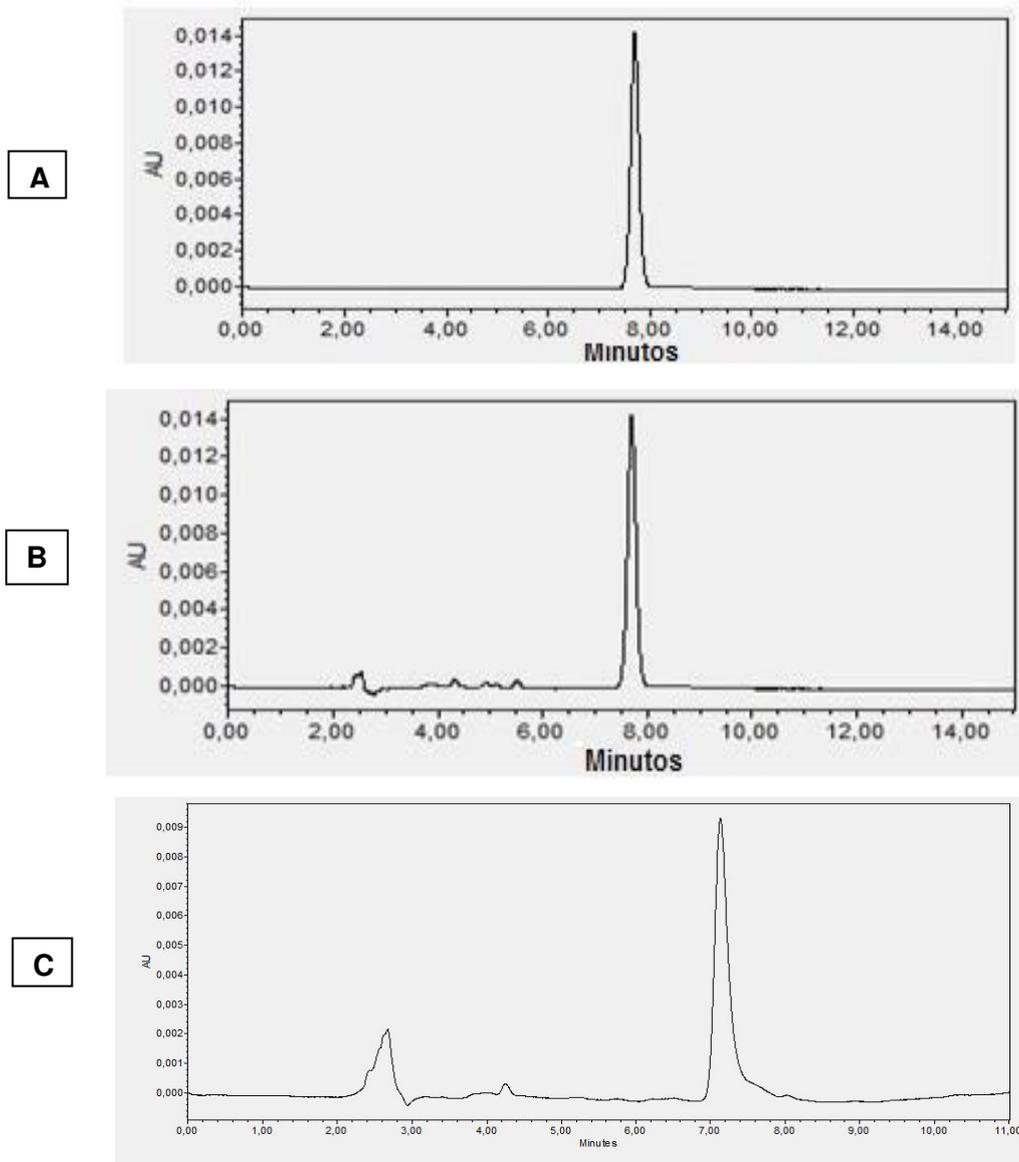


Figura 17 Especificidade do método de doseamento de cetoconazol por CLAE. A – Cromatograma do cetoconazol (SQR) em metanol a 6,0  $\mu\text{g/mL}$ ; B – Cromatograma do cetoconazol (utilizado nas formulações) em metanol a 6,0  $\mu\text{g/mL}$ ; C – Cromatograma do filtrado de nanoemulsão.

Nas ilustrações A e B da Figura 17, é possível observar os tempos de retenção estão em torno de 7,5 minutos de corrida e em torno de 7,69 minutos de corrida, respectivamente. O sinal analítico está presente no cromatograma da amostra filtrada (Figura 17C) em 7,19 minutos. Verifica-se então, o tempo de retenção nos cromatogramas das três amostras demonstram que o método não sofreu interferência dos componentes presentes quando quantificados a 244 nm.

### 5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção da curva de calibração (Altura do pico vs Concentração  $\mu\text{g/mL}$ ) nas concentrações 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ . Na curva analítica na Figura 18, apresentou linearidade, pois o coeficiente de Person ( $r$ ) igual a 0,991 está em de acordo com o valor preconizado pela ANVISA (2003), e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) encontrado foi de 0,999 que indica um ajuste de 99,9% entre a proposta e os resultados obtidos.

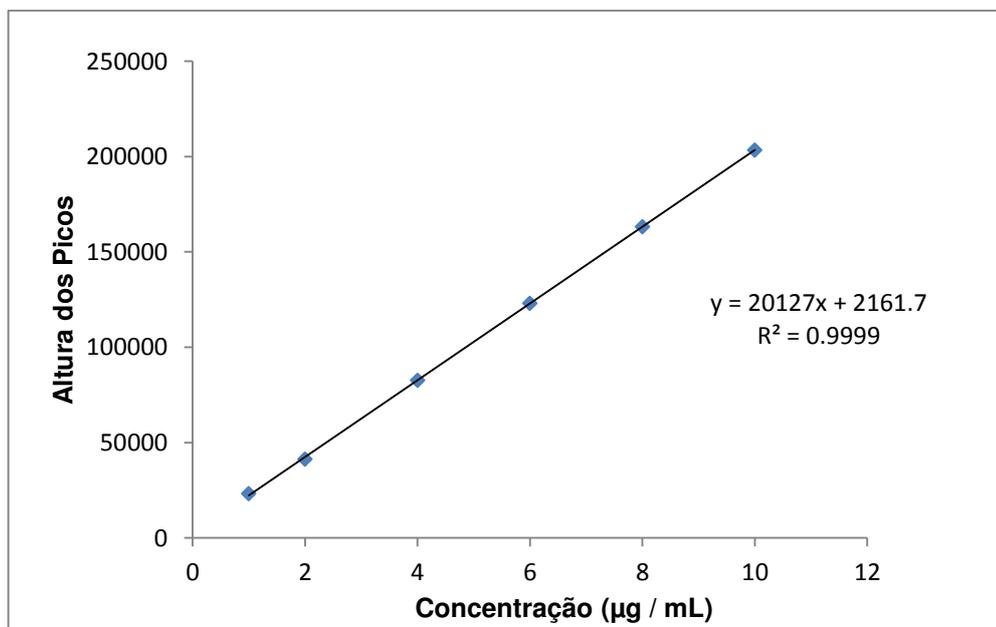


Figura 18 Curva analítica do cetozonazol pelo método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, nas concentrações de 1,0 a 10,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.3.3 Precisão Intermediária e Repetibilidade

As análises de precisão intermediária foram realizadas em dois dias com analistas diferentes, nas concentrações 2,0, 6,0 e 10,0 µg/mL, sendo os resultados expressos em coeficiente de variação. De acordo com a Tabela 6, o maior valor do coeficiente de variação foi de 1,37%, portanto está bem abaixo de 5%, valor preconizado pela ANVISA (2003).

Tabela 6 Resultados de Precisão Intermediária de quantificação de cetoconazol.

	Conc. (µg/mL)	Área (mV/s <sup>2</sup> )			Média da Conc.	Desvio Padrão	C.V. (%)
		1° Ensaio	2° Ensaio	3° Ensaio			
<b>1° Analista dia 1</b>	2	40349	41392	40682	1.9201	0.0264	1.3784
	6	99482	99520	101080	4.8624	0.0453	0.9317
	10	166259	167083	163012	8.1129	0.1069	1.318
<b>2° Analista dia 2</b>	2	30578	30739	30260	1.4092	0.0121	0.7235
	6	97572	97460	97571	4.7385	0.0031	0.0674
	10	157738	157326	157326	7.6879	0.0556	0.8593

Conc. – Concentração; C.V. - Coeficiente de Variação

A repetibilidade foi determinada pela quantificação da concentração de 6,0 µg/mL, realizadas no mesmo dia por seis vezes, sendo o resultado expresso como coeficiente de variação. Os coeficientes de variação apresentados na Tabela 6, foram abaixo de 5%, conforme recomenda a RDC n° 899 da ANVISA (2003)

Tabela 7 Resultados de Repetibilidade de quantificação de cetoconazol.

	Área (mV/s <sup>2</sup> )	Concentração (µg/mL)
6,0 µg/mL	100995	4.9105
	101178	4.9196
	100571	4.8894
	100081	4.8651
	101411	4.9311
	100526	4.8872
Média	100793.667	4.9005
Desvio padrão	489.5849	0.0243
Coeficiente de variação (%)	0.48572	0.4963

Os resultados dos parâmetros analisados descritos nas Tabelas 6 e 7, refletem que o método possui precisão e repetibilidade satisfatória para quantificar o cetoconazol.

### 5.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, de acordo com a Tabela 8. Os valores de recuperação (%) encontrados estão dentro da faixa aceitável, de 80 a 120%, conforme Ribani e Colaboradores (2004). Tais valores confirmam que o método exato.

Tabela 8 Resultados obtidos para o teste de recuperação do cetoconazol.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Recuperação (µg/mL)				Recuperação (%)
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	
2	2.575	1.8531	1.477	1.9684	98.42
6	7.5242	5.3518	4.906	5.9273	98.78
10	11.2986	9.5125	8.8332	9.8814	96.81

### 5.3.5 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)

A partir de avaliações feitas pela curva de calibração, conforme o ICH (1996) os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,43 µg/mL e 1,45 µg/mL, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método.

Desta forma, constata-se que o método desenvolvido para quantificação do cetoconazol na NE deste estudo é específico, linear, sensível, preciso e exato, pois os resultados encontrados atendem as recomendações da ANVISA.

## 5.4 Tamanho da gotícula, Índice de polidispersidade (IP) e Potencial Zeta (PZ)

### 5.4.1 Efeito da concentração do Tenssoativos

A concentração dos tensoativos variaram de 7 a 10%, em formulações de 2% de óleo de açaí e completado com água qsp 10 mL, sendo estas observadas macroscopicamente, tamanho da gota, índice de polidispersidade e potencial zeta após 24 horas, 5 e 15 dias (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 Dados da estabilidade das formulações preparadas com diferentes teores (7%, 8%, 9% e 10%) de Brij™ CS20 (B7, B8, B9 e B10, respectivamente).

Amostra	1 dia			5 dias			15 dias		
	T (nm)	IP	PZ (mV)	T (nm)	IP	PZ (mV)	T (nm)	IP	PZ (mV)
<b>B7</b>	193,0	0,40	- 24,7	190,0	0,35	- 32,0	174,7	0,28	-34,5
<b>B8</b>	171,0	0,38	- 28,9	173,0	0,38	- 41,5	204,4	0,44	-40,3
<b>B9</b>	148,0	0,25	- 18,5	148,6	0,27	- 33,0	141,8	0,26	-31,4
<b>B10</b>	133,8	0,38	-27,8	129,5	0,36	- 27,0	124,0	0,39	-33,0

T: Tamanho; IP: Índice de Polidispersidade; PZ: Potencial Zeta

Tabela 10 Dados da estabilidade das formulações preparadas com diferentes teores (7%, 8%, 9% e 10%) de Croduret™ 50 (C7, C8, C9 e C10, respectivamente).

Amostra	1 dia			5 dias			15 dias		
	T (nm)	IP	PZ (mV)	T (nm)	IP	PZ (mV)	T (nm)	IP	PZ (mV)
<b>C7</b>	218,4	0,44	-40,7	202,6	0,36	-27,7	125,3	0,70	-44,8
<b>C8</b>	63,42	0,57	-40,4	63,86	0,57	-20,8	92,56	0,92	-29,3
<b>C9</b>	27,64	0,28	-13,8	26,04	0,20	-22,2	75,37	0,24	-41,2
<b>C10</b>	28,46	0,27	-25,0	24,88	0,20	-25,0	53,02	0,18	-31,9

T: Tamanho; IP: Índice de Polidispersidade; PZ: Potencial Zeta

As amostras, macroscopicamente, apresentaram-se com aspecto translúcido amarelado e reflexo azulado. O aspecto amarelado deve-se ao óleo de açaí que possui clorofila em sua constituição (PACHECO-POLENCIA *et al.*, 2008).

Foi possível observar a diminuição do tamanho das gotículas à medida que aumentaram as concentrações dos tensoativos. Este fato ocorre devido a maiores quantidades de tensoativos reduzirem a tensão interfacial das gotículas de óleo, resultando em menor energia necessária para quebrá-las em tamanhos menores (FERNANDEZ *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2007 e DAS *et al.* 2012). A presença de tensoativo garante um tamanho pequeno da gotícula, porém a partir de determinada concentração não se observa redução do tamanho e nem melhoria da estabilidade física do sistema (DAS, *et al.* 2012).

Outro fator que pode ser verificado nas formulações é uma tendência a reduzir o índice de polidispersidade com o aumento das concentrações dos tensoativos. As formulações contendo 9 e 10% de tensoativos durante o período observado, apresentaram um baixo índice de polidispersidade, variando entre 0,1 e 0,3 (Tabelas 9 e 10). Isto significa que estas formulações apresentaram um comportamento unimodal indicando uma estreita distribuição de tamanho das gotículas da formulação. Este comportamento acontece também pela mesma razão descrita na diminuição de tamanho (DAS, *et al.* 2012).

Com relação ao PZ, no 15<sup>o</sup> dia os valores ficaram em entre -29,3 e -44,8 mV. Estes resultados estão de acordo com Roland e Colaboradores (2003). Este comportamento significa que a força repulsiva da dupla camada é maior do que a força atrativa de London, evitando a formação de agregação. Morais e Colaboradores (2006) relataram que a taxa de PZ observada sobre as gotículas da NE surge como resultado de pontes de hidrogênio na cadeia polioxietileno e a concentração na superfície das cadeias.

Conforme os resultados apresentados, verificou-se que o método PIT é adequado para obtenção de nanoemulsões óleo em água composto de óleo de açaí:Brij<sup>TM</sup> CS20 (formulações B7, B8, B9 e B10) e açaí:Croduret<sup>TM</sup> 50 (C7, C8, C9 e C10), visto que as formulações mantiveram-se estáveis por 15 dias e apresentaram aspecto translúcido, com reflexo azulado e tamanhos de gotículas nanométricas.

Após observação do comportamento dos sistemas formados, foram selecionadas as formulações B10 e C10 (contendo 10% de tensoativo), para

continuar os estudos por apresentarem melhores resultados quanto ao tamanho, à polidispersidade e ao PZ.

#### **5.4.2 Efeitos da Concentração de Cetoconazol**

As formulações selecionadas, B10 e C10, quanto a concentração de tensoativos de 10%, foram adicionadas concentrações de cetoconazol de 0,5 e 1%. As formulações B10 e C10 adicionadas de Cetoconazol a 1% apresentaram desestabilização após 24 horas. Assim como, a C10 com 0,5% de Cetoconazol. Portanto estas formulações foram descartadas para a continuação do estudo. Já a formulação B10 com 0,5% de Cetoconazol não apresentou sinais macroscópicos de instabilidade.

A Tabela 11 apresenta valores dos tamanhos, índice de polidispersidade e potencial zeta do sistema contendo cetoconazol a 0,5% (p/v), e a Tabela 12 apresenta os valores dos mesmos parâmetros do sistema sem Cetoconazol.

É possível verificar na Tabela 11 que houve pequena variação de tamanho e índice de polidispersidade. Porém, observa-se uma tendência a diminuir o potencial zeta após 30 dias. Resultados aproximados a esses foram encontrados por Oliveira e Colaboradores (2016) em estudos de nanoemulsão contendo óleo de *Pterodon emarginatus* Vogel, popularmente conhecida como sucupira, preparadas pelo método de inversão de fase. Os autores obtiveram gotículas de tamanhos até 182 nm com potencial zeta numa faixa de -5.6 mV e IP de 0,188.

Percebe-se também, que os resultados demonstrados na Tabela 11 apresentam valores próximos dos resultados da Tabela 12 (sem cetoconazol), mesmo após trinta dias. Sugerindo que o Cetoconazol não influenciou os parâmetros estudados.

As Figuras 19 e 20 mostram resultados apresentados no Zeta ziser Nano Series (Tamanho, IP e PZ) da formulação B10 com 0,5% de Cetoconazol, após 24 horas e 30 dias em conformidade com os dados da Tabela 11.

Tabela 11 Média dos tamanhos, índice de polidispersidade e potencial zeta dos sistemas B10 contendo cetoconazol.

Dias de Análises	T (nm)	IP	PZ (mV)
1 <sup>o</sup> D	133.07 ± 9.99	0.32 ± 0,04	-27.97 ± 4.46
15 <sup>o</sup> D	128.40 ± 3,84	0.31 ± 0,05	-24.93 ± 1,89
30 <sup>o</sup> D	128.53 ± 10,04	0.37 ± 0,04	-25.53 ± 0,36

D: Dia; T: Tamanho; IP: Índice de Polidispersidade; PZ: Potencial Zeta

Tabela 12 Média do tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dos sistemas B10 sem cetoconazol.

Dias de Análises	T (nm)	IP	PZ (mV)
1 <sup>o</sup> D	130.23 ± 2,41	0.32 ± 0,04	-25.73 ± 2,38
15 <sup>o</sup> D	128.13 ± 5,68	0.32 ± 0,04	-25.77 ± 4,19
30 <sup>o</sup> D	127.35 ± 2,15	0.33 ± 0,04	-28.80 ± 1,89

T: Tamanho; IP: Índice de Polidispersidade; PZ: Potencial Zeta

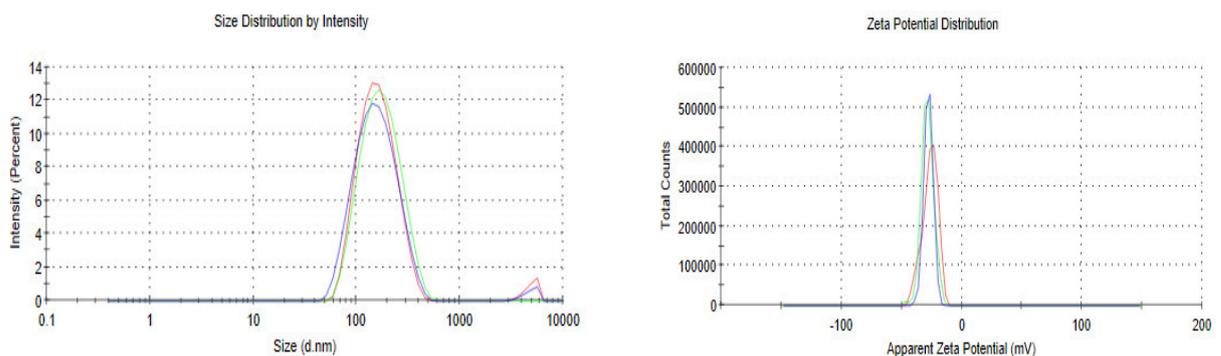


Figura 19 Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta da formulação B10 contendo 0,5% de cetoconazol após 24 horas (1 dia).

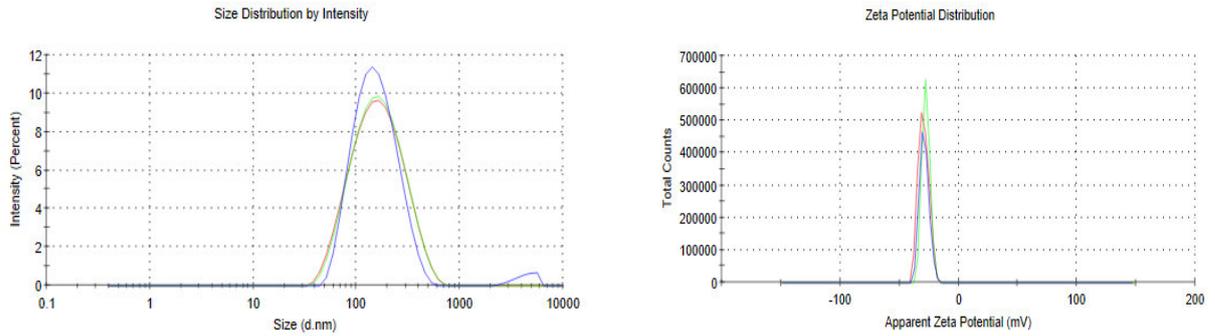


Figura 20 Tamanho das gotículas (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta da formulação B10 contendo 0,5% de cetoconazol após 30 dias.

## 5.5 Morfologia

A Figura 21 mostra as imagens captadas por microscopia eletrônica de transmissão. A imagem sugere que as gotículas apresentaram formato esférico, como observado em outras literatura.

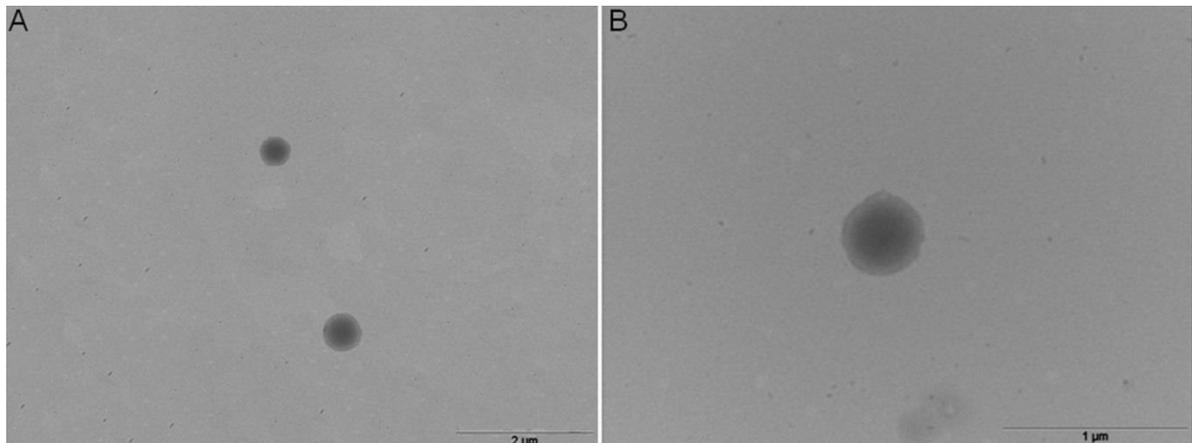


Figura 21 Imagens da nanoemulsão B10 com 0,5% de cetoconazol por MET (Magnitude de 30x e 50x, respectivamente).

## 5.6 Eficiência de Encapsulação

A EE corresponde à quantidade de fármaco que foi incorporado nas NE (TAMJIDI *et al.*, 2013).

A avaliação do percentual da EE da fórmula B10 com cetoconazol à 0,5 % foi realizada por CLAE validado. A equação da reta obtida na curva de calibração do cetoconazol em metanol foi usada para verificar a concentração do fármaco livre na fase aquosa da NE. A EE foi estimada em  $98,31\% \pm 0,14$ , demonstrando que a maior parte do fármaco se encontra associado às gotículas. Este resultado possivelmente deve-se a natureza lipofílica do cetoconazol. Além disso, a análise térmica demonstrou boa afinidade do fármaco com o óleo (Figura 18). Estudos realizados por Santos e Colaboradores (2009) verificaram que Teossomas de idebenona, contendo componente lipídico, apresentaram EE superior a 99%. Nemem e Lemos-Senna (2011) estudaram o resveratrol em NE, em nanopertícula sólida e microemulsão, onde apresentou EE em torno de 94 %. Portanto o resultado encontrado na EE do cetoconazol na NE com óleo de açaí é satisfatório.

## 6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de nanoemulsão a partir de óleo de açaí foi constituído em duas fases distintas. A primeira consistiu no conhecimento do óleo, quanto suas propriedades físico-químicas e constituição química. A segunda fase e, a principal, consistiu no estudo de pré-formulação e na obtenção e caracterização da nanoemulsão utilizando óleo de açaí como fase oleosa.

Quanto às características físico-químicas, observou-se valores característicos do óleo de açaí, pois foram similares aos descritos na literatura e dentro dos padrões aceitáveis pela legislação brasileira. No perfil de ácidos graxos do óleo, constatou-se o predomínio de ácidos graxos mono e poli-insaturados, como os ácidos oleico, ácidos linoleico e ácidos palmitoleico. O perfil encontrado foi corroborado pelas bandas bem definidas que correspondem a grupos funcionais presentes nos ácidos graxos obtidos na espectroscopia na região do infravermelho. As análises térmicas mostraram um perfil típico de óleos vegetais, onde a degradação térmica ocorre acima de 200°C. Os resultados de caracterização físico-química e controle de qualidade do óleo mostraram-se satisfatórios, quanto ao emprego no desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados.

Os estudos de pré-formulação foram conduzidos usando-se o DSC, onde observou-se que não houve indícios de interações químicas ou físicas que pudessem interferir no prosseguimento do estudo.

O método de doseamento do Cetoconazol nas nanoemulsões mostrou-se específico, sensível, linear, exato e preciso.

O sistema nanoemulsionado foi preparado por um método de baixa energia, PIT, e isento de solventes, reduzindo os custos do processo e estando de acordo com os requisitos de produtos ecológicos. Além do mais, a utilização de tensoativos classificados como *eco-friendly* também é uma vantagem.

A nanoemulsão, formulação B10 contendo 0,5% de cetoconazol, mostrou-se estável, com faixa de tamanho de 193,0 a 124,0 nm, formato esférico, características adequadas para aplicação tópica, além de mostrar-se eficaz quanto a eficiência de encapsulação.

Assim, com este trabalho experimental, pode-se afirmar que o óleo de açaí tem potencial para ser empregado como insumo farmacêutico podendo ser usado

como fase oleosa de nanoemulsões, para veicular ativos lipofílicos, em aplicações como sistemas *drug delivery* por via tópica. No entanto, há necessidade de continuação dos estudos para realizar ensaios adicionais de caracterização, assim como o estudo *in vitro* e *in vivo*, ou incorporação em uma base para promoção de uma formulação de uso farmacêutico ou cosmético.

## REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R. Nanometric scaled emulsions (Nanoemulsions). *Iranian J. Pharm. Res.*, vol. 9, p. 325–326, 2010.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia de Validação de Métodos Analíticos. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, 2007.
- ALICE, L.; RUPPENTHAL, J.E.; BECK, R.C.R. A inovação em nanotecnologia farmacêutica no bloco econômico do BRIC. **Revista Ciência e Tecnologia**, v.14, n.24/25, p.65-76, jan./dez. 2011.
- AMSELLEM-LAUFER, M. *Euterpe oleracea* Martius (Arecaceae) Açai. **Phytothérapie**, v. 13, p. 135-140, 2015.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and recommended practices of the American Oil Chemists's Society**. Champaign: A.O.C.S, 4th ed.,1995.
- ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA FILHO, P. A. Influence of PEG- 12 dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystals. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 211-218, 2007.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, V.G.; ALLEN, Jr. L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377 , p142–147, 2009.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do CEPPA**, v. 19, p. 325-380, Curitiba, 2001.
- Available for review: Director, **Cosmetic Ingredient Review**. *International Journal of Toxicology*, 18 (Supl. 3): 41-49,1999.
- BABY AR. Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas. [tese doutorado em Fármacos e Medicamentos]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo; 2007.
- BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v. 56, n.5, p.603-618, 2004.

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

BERNARDI, D.S.; PEREIRA, T.A. ; MACIEL, N.R. ; VIEIRA, G. S.; BORTOLOTO, J. ; OLIVEIRA, G. C. ; ROCHA FILHO, P. A. . Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 44-50, 2011.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, Ed Port., v.15, n.5, p. 46-49, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico Para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais E Creme Vegetal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**. Brasília, 23 de setembro de 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA, Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances, v. 1 & 2, 2009.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quim. Nova**, vol. 35, p. 1827-1840, 2012.

CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTTO, E.V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quim. Nova**. v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

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

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Editora da UNICAMP: 2º Ed. rev.- Campinas, SP, editora da UNICAMP, p. 207, 2003.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the Pulp and Kernel Oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of Food Science**. v.76, n.8, p.1156-1161, 2011.

COÏSSON, N J.D., TRAVAGLIA, F., PIANA G., CAPASSO M., ARLORIO M. *Euterpe oleracea* juice as functional pigment for yogurt. **Food Res Int** vol. 38, p. 847-853, 2005.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, p. 274-277, 1996.

CÓRDOVA-FRAGA, T.; ARAUJO, D. B.; SNACHEZ, T. A.; ELIAS JÚNIOR J.; CARNEIRO A. A. O.; BRANDT-OLIVEIRA R.; SOSA M.; BAFFA O. *Euterpe oleracea* (Açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: preliminary results. **Magn Reson Imaging**. v.22, p.389-393, 2004.

COSMETIC INFOS. Lauric Acid. Disponível em <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/lauric-acid>. Acessado em 26/03/2016.

**Cosmetic Ingredient Review**. Amended Safety Assessment of PEGylated Oils as Used in Cosmetics Safety [http://www.cir-safety.org/sites/default/files/pegoil122012final\\_faa-final%20for%20posting.pdf](http://www.cir-safety.org/sites/default/files/pegoil122012final_faa-final%20for%20posting.pdf)  
acesso em 04/2016

COSTA, H. M. da.; RAMOS, V. D.; ABRANTES, T. A. S. A.; CASTRO, L. L. Y.; VISCONTE, L. L. Y.; NUNES, R. C. R.; FURTADO, C. R. G. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 14, n.1, 2004.

COSTA. M. N. F. S; MUNIZ, M. A. P.; NEGRÃO, C. A. B.; COSTA, C. E. F.; LAMARRÃO, M. L. N.; MORAIS, L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C; COSTA, R. M. R., Characterization of *Pentaclethra macroloba* oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.115, p. 2269-2275, 2013.

COSTA, R. S.; BRITO, N. A.; CAMELO, S. R. P.; RIBEIRO-COSTA, R. M.; BARBOSA, W. L. R.; COSTA, C. E. F.; SILVA JÚNIOR, J. O. C.. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, p. 1959-1964, 2013.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (CLNs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loades SLNs and CLNs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139-151, 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.6, p. 1539-1545, 2004.

DWECK, J., SAMPAIO, M. S. Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous TG/DTA. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.75, p. 385–391, 2004.

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

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; CULLOUGH, J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, in press. 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª ed. Parte I. São Paulo, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

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

FERRARI, M., ROCHA-FILHO, P. A. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). **Rev. bras. farmacogn.** v.21, n.4, p. 737-743, 2011.

FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Physicochemical characterization of the fruit and oil extracted from tucuman (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.4, p. 427-433, out./dez. 2008.

FERREIRA, S. B.; FAZA, L. P.; HYARIC, M. L. A comparison of the physicochemical properties and fatty acid composition of indaiá (*Attalea dubia*) and babassu (*Orbignya phalerata*). **The Scientific World Journal**, 2012.

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

FONSECA, M. M. D. A, YOSHIDA, M.I. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. **VÉRTICES**, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 11, n. 1/3, p. 61-75, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FRONZA, T.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em Direção ao Estabelecimento de Marcos Regulatórios**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**, 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 281-288, 1998.

GALLETI, S. R. **Introdução à microscopia eletrônica**. Instituto Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez., 2003.

GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm). **Chromatographia**, v. 59, p. 739-743, 2004.

GHANNOUM, M. A. & RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin.Microbiol.Rev.**, 12(4):501-17, 1999.

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

GUIMARÃES, I. S. S. Corantes naturais vermelhos e amarelos. In: RESUMOS DO I SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS PARA ALIMENTOS. Campinas. **Resumos**. Campinas, Ital, p. 21-25, 1987.

GUIMARÃES, K. L.; RÉ, M. I. Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC) **Nanocosmetics and Nanomedicines**, p. 101-122, 2011.

GUNSTONE, F. D. **The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses**. USA: CRC Press, 2004.

GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. The Lipid Handbook. 2nd ed. London: Chapman & Hall. p. 551, 1994

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, v.13, p.6964-6971, 1997.

HEINRICH, M.; DHANJI, T, CASSELMAN, I. Açai (Euterpe oleracea Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, nº 4, p. 10–21. 2011.

HOMMOSS, A. **Nanosestructured lipid carriers (NLC) in dermal end personal care formulations**. 2009. 202 f. (Tese de Doutorado) – Departamento f Biology. Chemistry and Pharmacy of the Freie Universitat Berlin, Berlin, 2009.

HUANG, X.; TANOJO, H.; LENN, J.; DENG, C. H.; KROCHMAL, L. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 26-38, 2005.

**INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH);** Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1996.

IONASHIRO, M.A.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, São Paulo, v.26, n.121, p.17-24, 1980.

JAVIDNIA, K. PARISH, M., KARIMI, S., HEMMATEENEJAD, B. Discrimination of edible oils and fats by combination of multivariate pattern recognition and FT-IR spectroscopy: A comparative study between different modeling methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. V. 104, p. 175–181, 2013.

JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 181, p. 247-243, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª edição, Rio de Janeiro, 2008.

KOURNIATIS, L.R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E.; GONZÁLES. G. Nanoemulsões de óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v.33, n. 2, p. 295 – 300, 2010.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S77-S98, 2002.

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

KUNLE, O.F.; EGHAREVBA, H.O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines-A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**. vol. 4, n.3, p. 101-111, 2012.

LACERDA, S. P.; CERIZE, N. N.; RÉ, M. I. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, p. 312 – 321, 2011.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 447(1-2), p. 12-21, 2013.

LEE, A. G.; EAST, J. M.; FROUD, R. J. Are essential fatty acids essential for membrane function? **Prog Lipid Res**. v. 25, 1986.

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

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. 2ª Ed. São Paulo: Medfarma Livraria e Editora, 2004.

LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V. Heat-oxidation stability of palm oil blended with extra virgin olive oil. **Food Chemistry**. vol 135, p. 1769–1776, 2011

LICHTENTHÄLER, R.; BELANDRINO, R.; MAIA, J.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total antioxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) fruits. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, v. 56, p. 53-64, 2005.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. Teory of emulsions. *Pharmaceutical Dasage Forms: Disperse Systems*, v. 1, p. 49-91, New York.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; ABREU, L.R.P.; SILVA, L.B.L.; WANDERLEY, A.G.; SANTANA, D.P.; Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 1, p. 36-41, jan./mar., 2004.

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, 2006.

LOWE, N. J.; STOUGHTON, R. B. Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. **British Journal of Dermatology**, v. 96, p. 155-162, 1977.

LUBRANO, C.; ROBIN, J. R.; KHAJAT, A. Composition em acides grãs, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. **Oléagineux**, v. 49, n.2, 1994.

MAIA, E.L. Material Didático Teórico. **Tecnologia do Pescado I**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. Man031171. Issue 2.2. March, 2005.

MANTOVANI, I. S. B.; FERNANDES, S. B.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Constituintes apolares do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* M. – Arecaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 41-42, 2003.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. VI (2), p.01-37, 2009.

MARTINS, M. R. E VEIGA, F. Permeation enhancers in transdermal drug delivery systems: a new application of cyclodextrins. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38(1), p. 33-54, 2002.

MATHEUS, M. E.; FERNANDES, S. B. O.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. S.; FERNANDES, P. D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. On nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 291-296, 2006.

MEHNERT, W., MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p. 165-196, 2001.

MEILUNAS, R. J.; BETSEN, J. G.; STEINBERG, A. Analysis of aged paint binders by FTIR spectroscopy. **Studies in Conservation**, v. 35, p. 33-51, 1990.

MONGE-FUENTES, V. **Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo***. Brasília 2014. 163p. Tese de doutorado em Biologia Animal da Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasil.

MORAIS, G.G; SANTOS, O.D.H.; OLIVEIRA, W.P., ROCHA FILHO, P.A.. Attanment of o/w emulsions containing liquid Crystal from annatto oil (*Bixa orellana*), coffe oil, and tea tree oil (*Melaleuca aternifolia*) as oily phase using HLB and ternary phase diagram. **Journal of dispersion sciense and technology**. 29:297-306, 2008.

MORAIS, J. M. DE, SANTOS, O. D. H. DOS, DELICATO, T., GONÇALVES, R. A., ROCHA-FILHO, P. A. DA. Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water

Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.27, p.109–115, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Definição de óleos e Gorduras tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo. Varela, 1998.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MÜLLER, R. H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BRÖMER, S. SolEmuls® - novel technology for the formulation of i.v emulsions with poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v.269, p. 293-302, 2004.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Rev. Bras. Frutic.** v. 30, n. 2, 2008.

NEHDI, I. A. *Cupressus sempervirens* var. horizontalis seed oil: Chemical composition, physicochemical characteristics, and utilizations. **Industrial Crops and Products**, v.41, n.1, p. 381– 385, 2013.

NEMEN, D; LEMOS-SENNA, E. Preparação e Caracterização de Suspensões Coloidais de Nanocarreadores Lipídicos contendo Resveratrol destinados à Administração Cutânea. **Revista Química Nova**, Florianópolis, v. 34, nº 3, p. 408-413, 2011.

NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 20, jan-fev, p. 22, 2008.

NUNES, K. M. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Farmácia. Instituto de Ciências da saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Manole, 2006.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, C. F.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; SANTOS, K.; CONCEIÇÃO, E. C. DA; OLIVEIRA, L. A. R. DE; KELECOM, A.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T.. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. **PLOS ONE**, v.11(1), 2016.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. DE L. Análise Térmica Aplicada a Fármacos E Formulações Farmacêuticas Na Indústria Farmacêutica. **Química Nova**, v.34, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, R. E SANTOS, D. Sistemas Transdérmicos. In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (Eds.). *Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos*. Universidade Fernando Pessoa. Porto, p. 151-165, 2011.

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, Nigeria 2002.

PACHECO-PALENCIA, L.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. Phytochemical antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Res Int**, v. 40, p. 620-628, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and Biological Activity of Phitochemical-Rich Extracts from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 3593-3600, 2008.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos**. 2008.185p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

PATHAN, I. B.; SETTY, C. M. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8 (2), p. 173-179, 2009.

PESSOA, J. D. C., TEIXEIRA G. H. DE A. **Tecnologias para inovação nas cadeias euterpe**. Embrapa, Brasília, 2012.

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

PIROT, F.; BERARDESCA, E; YOGESHVAR, K.; SINGH, M; MAIBACH, H I; GUY, R. H. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and noninvasive quantitation in vivo. *Pharmaceutical Research*. vol. 15, n. 3, p. 492-4, 1998.

PLOTKIN, M. J.; BALICK Medicinal uses of South American palms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 157-179, 1984.

PONS, E. L.; MACHADO, M. R.; KORTZ, D. E. M.; SCHNEIDER, R. de C. de S.; KIST, L. T.; MARTINELLI, M.; CARAMÃO, E. B. **Estudo físico-químico do óleo de variedades de *Ricinus Communis* L existentes no vale do rio pardo - Rio Grande do Sul**. In: XXIII Reunião Anual da SBQ, 2000.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1. Lisboa, 1991.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid Nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, 357, p. 295 – 304, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M; RITTER, J. M. Farmacologia. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RIBANI M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA A. F.; DARIN J. D. C.; DE ROSSO V. V.; MERCADANTE A. Z.; BIANCHI M. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutat Res** v.695, p.22-28, 2010.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos, p.194. 2004.

ROCHA, A. P. M.; CARVALHO, L. C. R. M., SOUSA, M. A. V., MADEIRA, S. V. F., SOUSA, P. J. C.; TANO, T.; SCHINI-KERTH V. B.; RESENDE, A. C.; MOURA, R. S. DE. Endothelium-dependent vasodilatador effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vasc Pharmacol**, v. 4, p. 97-104, 2007.

RODRIGUES, A.M.C; DARNET, S.; SILVA, L.H.M. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **J. Braz. Chem. Soc.** vol.21, no.10, São Paulo, 2010.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação.** Universidade Federal do Pará, Belém, 2000.

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

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

ROWE, R. C.; SHEYKEY, P.J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients 6. edição. **Washington, Pharmaceutical Press**, p. 473, 2009.

SANTOS, G. S.; POHLMANN, A. R.; ASSUMPÇÃO, E. R.; COLOMÉ, L. M.; RAFFIN, R. P. Preparação e caracterização físico química de teossomas contendo idebenona. Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (21:2009 out. 19-23). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

SANTOS, F. K.; GARNERO, C.; OLIVEIRA, R. N. DE; SOUZA, A. L. R. DE; CHORILLI, M.; ALLEGRETTI, S. M.; LONGHI, M. R.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M.

P. D. Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the *In Vitro* Schistosomiasis Activity of Praziquantel. **J. Nanosci. Nanotechnol**, v.15, p.761-772, 2015.

SCHAUSS, A.; WU, X.; PRIOR, R.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8598-8603, 2006.

SHAH, R. M.; MALHERBE, F.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E. A.; HARDING, I. H. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 428, p. 286-294, 2014.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac, **AAPS PharmSciTech** 8, 2007.

SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açai (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Química Nova**, vol.36 n<sup>o</sup>.3, 2013.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Aplicação de diagrama ternário água-tensoativo-óleo no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e/ou cosméticas**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.

SILVA JUNIOR, J. O. C.; Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC). **Nanocosmetics and Nanomedicines**, pp.101-122, 2010

SILVA, P. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup> Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

SILVA, S. M; SAMPAIO, K.A.; TAHAM, T; ROCCO, S.A.; CERIANI; MEIRELLES, A.J.A. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the brazilian amazon region. **J Am Oil Chem Soc**.Vol. 86, p. 611-616, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7<sup>a</sup> edição, Editora: LTC, 2006.

SÓLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; CELMA, M.J.G. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, vol 10, Barcelona, 2005.

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

SOLÍS-FUENTES, J. A.; CAMEY-ORTÍZ, G.; HERNÁNDEZ-MENDEL, M.R.P.R.; PÉREZ-MENDOZA, F.; DURÁN-DE-BAZÚA, C. *Bioresource Technology*, v.101, p. 799-803, 2010.

SOUTO E. B. & MULLER R. H. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. **Journal of Microencapsulation**, v. 22(5), p. 501–510, 2005.

SOUZA, D. de F. S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C.; BIZZO H.R. Estabilidade oxidativa dos óleos de macadâmia e de Pistache. **Boletim CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 141–156, 2007.

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

STRÖHER, A.; ARMIJO, C. J. V.; RAFFIN, R. P. Nanocosméticos: Conceitos, vantagens e aplicações. **Cosmetics & Toiletries**, v. 22, p. 55-60, 2010.

TAKAGI, S.; TOJO H.; TOMITA, S.; SANO, S.; ITAMI, S., HARA, M.; INOUE S., HORIE K., KONDOH, G.; HOSOKAWA, K., GONZALEZ, F. J.; TAKEDA J. Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. **The Journal of Clinical Investigation**. v.112, n. 9, p.1372-1382, 2003.

TAMJIDI, FARDIN, MOHAMMAD SHAHEDI, JALEH VARSHOSAZ,ALI NASIRPOUR. Nanostructured Lipid Carriers (Nlc): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.19, p. 29-43, 2013.

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

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 351-360, 2005.

WALIA, M.; RAWAT, K.; BHUSHAN, S. PADWAD, Y.S.; SINGH, B. Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. **J Sci Food Agric**. Vol 94, p. 929–934, 2014.

**ANEXOS:**

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

***CERTIFICADO*****SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA  
DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA  
*SQRFB*****cetoconazol**

Lote: 1033

**Descrição:** pó branco a quase branco.

**Teor:** 99,8%, calculado em relação à substância dessecada, determinado por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1M.

**Armazenamento:** conservar o frasco bem fechado, protegido da luz e em refrigerador (em temperatura entre 2°C e 8°C).



Tabela 13 Resultado descritos no laudo de análise do cetoconazol fornecido pela Natural Pharma.

Análise	Especificação	Resultado
Identificação	Conforme USP	De acordo
Rotação específica	De -1,0 a +1,0°	0°
Ponto de fusão	148 – 152 °C	148 – 150 °C
Perda por secagem	Máximo de 0,05%	0,1%
Resíduo de ignição	Máximo de 0,10%	0,05%
Doseamento	98,0 – 102,0%	99,52%
Metais Pesados	Máximo de 0,002%	<0,002%
Pureza cromatográfica	Máximo de 2,0%	De acordo
Acetona	Máximo de 0,5%	0,0%
Acetoacetato	Máximo de 0,5%	0,22%
Dimetilsulfóxido	Máximo de 0,5%	0,0%