



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALBERTINO FREITAS SANTANA NETO

OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES GALÊNICAS CONTENDO NANO E
MICROCAPSULAS DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS

Salvador
2015

ALBERTINO FREITAS SANTANA NETO

OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES GALÊNICAS CONTENDO NANO E
MICROCAPSULAS DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de mestre em biotecnologia.

Orientadora: Dra. Lidércia C. R. Cavalcanti
Co orientadora: Dra. Juceni Pereira de Lima David

Salvador
2015

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

F866 Freitas, Albertino
OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES GALÊNICAS CONTENDO NANO E
MICROCAPSULAS DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS / Albertino Freitas. --
Salvador, 2015.
44 f. : il

Orientadora: Lidércia C. R. Cavalcanti.
Coorientadora: Juceni David.
Dissertação (Mestrado - Mestrado em Biotecnologia) --
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia,
2015.

1. Lipossoma. 2. Triterpênicos. 3. Micro/nanotecnologia..
4. Formulações. I. C. R. Cavalcanti, Lidércia. II. David,
Juceni. III. Título.

ALBERTINO FREITAS SANTANA NETO

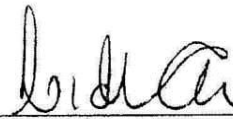
**OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES GALÊNICAS CONTENDO NANO E
MICROCÁPSULAS DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

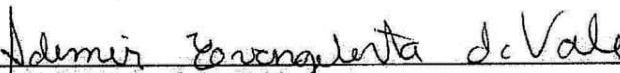
Aprovada em 12 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

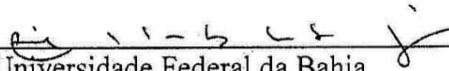
Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva – Orientadora
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Ademir Evangelista do Vale
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Anibal de Freitas Junior
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia.



SANTANA NETO, Albertino Freitas. Obtenção de formulações galênicas contendo nano e microcapsulas de ácidos triterpênicos. 44 f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante dos terpenóides. Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais.

O aumento da bioatividade destes ácidos pode apresentar um avanço na medicina como alternativa na terapia de diversas doenças. A inserção de novas tecnologias para produção de fármacos é de essencial importância na química de produtos naturais, a fim de tornar viável terapeuticamente algumas moléculas que possuem pouca expressão na natureza.

Nas últimas décadas, diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados visando a liberação controlada do fármaco e o possível aumento da eficácia e seletividade das formulações. Tornando-os uma ótima estratégia para a aplicação de substâncias lipofílicas, para promover liberação homogênea do ativo.

A importância no desenvolvimento de formulações baseia-se no fato que raramente os ativos são administrados isoladamente, sendo frequentemente inseridos em uma formulação.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de formulações contendo nano e micro cápsulas a partir de ácidos triterpênicos.

Os lipossomas de ácidos triterpênicos foram obtidos através da técnica de extrusão utilizando seringas conectadas, apresentaram relativa estabilidade coloidal em relação a processos de agregação observada pelo Potencial zeta. Os tamanhos das partículas se encontram próximos a 1 μ m, tanto para os lipossomas contendo ácidos triterpênicos quanto para os puros, identificados pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS), além da observação microscópica da morfologia e distribuição das microcápsulas as quais revelaram uma homogeneidade do diâmetro das vesículas e na distribuição na superfície na lâmina.

Quanto as formulações finais o pH compatível com o fisiológico informa ausência, ou pouca, interferência na pele. Os produtos são estáveis e viáveis no estresse produzido frente ao teste de centrifugação.

As formulações com os lipossomas possuem maior retenção de água, ampliando o poder de umectância da formulação. Dentre as quais a emulsão com lipossomas de ácidos triterpênicos possui melhor espalhabilidade e também a melhor preservação do efeito antioxidante no produto final.

A encapsulação de ácidos terpenicos pode ser considerada viável e promissora, como também sua incorporação em formulações com finalidades farmacológicas e cosméticas.

Palavras-chave: Lipossoma, Triterpênicos, Micro/nanotecnologia, Formulações.

SANTANA NETO, Albertino Freitas. Obtaining galenic formulations containing nano and microcapsules of triterpenic acids.44 f. 2015. Dissertation (Master degree) - Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, 2015.

SUMMARY

The triterpenes are perhaps the most important group of terpenoids. They have several medicinal properties, especially anti-inflammatory, analgesic, cardiovascular and anti-tumor effects.

The increased bioactivity of these acids may present an advance in medicine as an alternative in the therapy of various diseases. The insertion of new technologies for drug production is of essential importance in the chemistry of natural products, in order to make therapeutically viable some molecules that have little expression in nature.

In the last decades, different carrier systems have been extensively studied aiming the controlled release of the drug and the possible increase in the effectiveness and selectivity of the formulations. Making them an excellent strategy for the application of lipophilic substances, to promote homogenous release of the active.

The importance in the development of formulations is based on the fact that rarely the assets are administered alone and are often inserted into a formulation.

The objective of this work was to obtain formulations containing nano and microcapsules from triterpene acids.

The liposomes of triterpenic acids were obtained through the extrusion technique using connected syringes, presented relative colloidal stability in relation to the aggregation processes observed by zeta Potential. The particle sizes are close to 1 μ m for both triterpenic and pure acid-containing liposomes, identified by dynamic light scattering (DLS), as well as the microscopic observation of the morphology and distribution of the microcapsules, which reveal homogeneity of the diameter of the particles. Vesicles and on the surface distribution on the blade.

As for the final formulations the physiologically compatible pH informs the absence, or little, interference in the skin. The products are stable and viable in the stress produced against the centrifugation test.

Formulations with the liposomes have higher water retention, increasing the wetting power of the formulation. Among them, the emulsion with liposomes of triterpene acids has better spreadability and also the best preservation of the antioxidant effect in the final product.

The encapsulation of terpene acids can be considered viable and promising, as well as their incorporation in formulations with pharmacological and cosmetic purposes.

Key words: Liposome, Triterpenes, Micro / nanotechnology, Formulations.

Sumário

1.	Introdução	6
2.	Fundamentação teórica	10
3.	Objetivos	18
4.	Metodologia	19
	4.1. Obtenção dos ácidos triterpênicos	19
	4.2. Obtenção do sistemas nano e micro encapsulados de ácidos triterpênicos	19
	4.3. Avaliação dos sistemas nano e micro encapsulados de ácidos triterpênicos	21
	4.3.1. Potencial Zeta	21
	4.3.2. Espalhamento de luz Dinâmico(DLS)	21
	4.3.3. Microscopia óptica	22
	4.4. Obtenção das formulações galênicas: Emulsão e gel	22
	4.4.1. Preparo da emulsão	22
	4.4.1.1. Formulação de emulsão O/A	22
	4.4.1.2. Técnica de preparo da emulsão	23
	4.4.2. Preparo do gel	23
	4.4.2.1 Formulação do gel	23
	4.4.2.2 Técnica de preparo do gel	24
	4.5 Veiculações das nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos nas formulações galênicas (emulsão e gel)	24
	4.6 Avaliação das formulações galênicas	24
	4.6.1 Características Organolépticas	24
	4.6.2 Avaliação do pH	25
	4.6.3 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.	25
	4.6.4. Avaliação do poder de humectancia	25
	4.6.5. Espalhabilidade	25
	4.6.6. Determinação da atividade antioxidante	26
5.	Resultados e Discussão	27
	5.1 Potencial Zeta	27
	5.2 Espalhamento de luz Dinâmico (DLS)	28

5.3 Microscopia óptica	30
5.4 Veiculações das nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos nas formulações galênicas (emulsão e gel)	32
5.5 Características organolépticas	32
5.6 Avaliação do pH	32
5.7 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação	33
5.8. Avaliação do poder de umectante	34
5.9. Espalhabilidade	35
5.10 Determinação da atividade antioxidante	36
6. Considerações Finais	38
7. Referências	40

1. Introdução

1.1- Ácidos Triterpênicos

Os terpenos constituem uma grande família de metabólitos secundários, compreendendo cerca de 30.000 estruturas, classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas, ou seja, de cinco carbonos, que vão se ligando entre si, formando as seguintes classes: hemiterpenoides (C₅), monoterpenoides (C₁₀), sesquiterpenoides (C₁₅), diterpenoides (C₂₀), triterpenoides (C₃₀), tetraterpenoides (C₄₀) e politerpenoides (>C₄₀) (DUBEY et al., 2003). O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP). Os monoterpenos e sesquiterpenoides são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente como componentes na fabricação de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de, nas plantas, serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos e diterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias. Além disso, sesquiterpenos, tais como, ácido abscísico, bem como, diterpenos, tal como, giberelina atuam como fitohormônios. Os triterpenos e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz. Os terpenoides são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural apresentando importantes funções biológicas e fisiológicas e, por isso, muitos são utilizados na área farmacêutica (NIERO; MALHEIROS, 2007)

Os esteroides representam uma importante classe de substâncias terpênicas os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais. Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte solúvel (ose ou açúcar) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e micro-organismos (PERES, 2004).

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante dos terpenóides. Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. (NIERO; MALHEIROS; 2007). A exemplo do ácido betulínico que é um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos lupanos (Figura 1) e ocorre em muitas plantas, porém quase sempre encontrado em pequenas concentrações nas espécies vegetais. É conhecido pelas suas propriedades anti-inflamatórias, mas, que mais têm sido estudadas nos últimos anos são as anticancerígenas. Através das investigações decorridas descobriu-se o potencial citotóxico do ácido betulínico para as células de melanomas cancerígenos, não só em ratos como mesmo em células humanas. O triterpeno não só inibe o crescimento das células malignas, como provoca mesmo a autodestruição, a sua morte “programada” (apoptose) (PEZZUTO, Patente Americana nº 5 862 527, 1999, apud, SILVA, 2014).

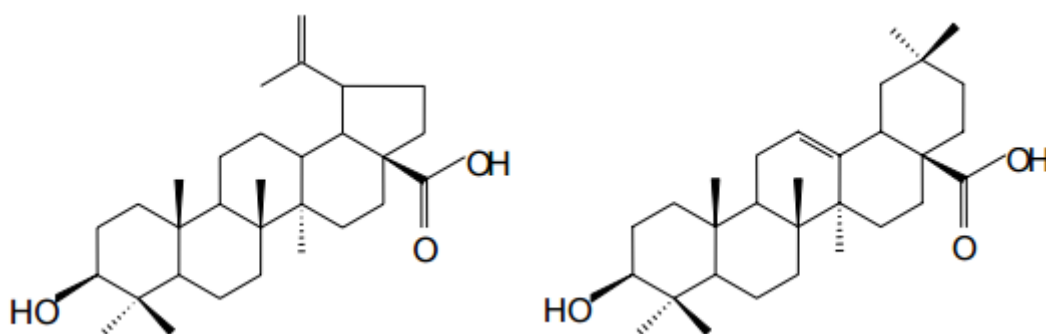


Figura 1 – Ácido Betulinico e Oleanólico, respectivamente.

A sua grande especificidade para as células tumorais tem também outra vantagem: não ataca as células saudáveis circundantes. Tendo em conta que os atuais medicamentos existentes no mercado funcionam como um veneno, matando e impedindo de se replicar qualquer tipo de células quer sejam malignas ou não, o ácido betulínico adquire certa vantagem sobre estes medicamentos. (PEZZUTO, Patente Americana nº 5 862 527, 1999, apud, SILVA, 2014).

O seu baixo custo, a sua fácil obtenção, a sua baixa toxicidade em organismos vivos e as características únicas antitumorais tornam o ácido betulínico o mais promissor triterpenóide a ser usado no tratamento do câncer.

Outro exemplo é o ácido oleanólico, um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos oleanos (Figura 1), também conhecido como ácido (3 β)-hidroxioleano-

12-en-28-óico. Do ponto de vista de suas características biológicas, este triterpeno é ativo contra câncer de pele (melanomas), porém exibe uma atividade inferior ao ácido betulínico. Normalmente, este triterpeno ocorre em mistura com o ácido ursólico em igual quantidade, assim, é sempre preferível à utilização do mais ativo, no caso o ácido ursólico. No entanto, a obtenção de alguns derivados de são muito mais ativos que o próprio ácido oleanólico. (SABINSA CORPORATION, 2000. Acesso em 08.04.12, apud, SILVA, 2014).

Mesmo assim, o ácido oleanólico possui uma maior capacidade anticancerígena que a maioria dos triterpenóides, e, como sendo relativamente fácil de encontrar na natureza, apresenta relevante importância medicinal. (SPORN, 2000, apud, SILVA, 2014).

1.2- Nanotecnologia

O aumento da bioatividade destes ácidos pode apresentar um avanço na medicina como alternativa na terapia de diversas doenças. A inserção de novas tecnologias para produção fármacos é de essencial importância na química de produtos naturais, afim de tornar viável terapeuticamente algumas moléculas que possuem pouca expressão na natureza.

Nas últimas décadas, diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados visando a liberação controlada do fármaco e o possível aumento da eficácia e seletividade das formulações. Para isso diferentes estratégias têm sido propostas, visto que, sistemas nanométricos têm uma grande área superficial. Tornando-os uma ótima estratégia para a aplicação de substâncias lipofílicas, para promover liberação homogênea do ativo.

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica. Tem o potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos.

A nanotecnologia consiste na habilidade de manipular a matéria em escala nanométrica, ou seja, uma escala que corresponde a 1 bilionésimo do metro, com o objetivo de criar estruturas com uma organização molecular diferenciada. Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica no

tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias (PEREIRA et al, 2006)

Carreadores coloidais de fármacos, incluindo as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, têm atraído um crescente interesse nos últimos 20 anos. Sendo utilizados como veículos para administração tópica de fármacos lipofílicos por permitirem a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. (VERMA et al, 2003; SHIM et al 2004; CEVEC et al, 2004).

As nanopartículas possuem algumas características vantajosas que fazem delas carreadores promissores para aplicações tópicas, como a capacidade de proteção a compostos lábeis contra degradação química, possibilidade de controle da liberação da substância ativa e podem atua como agentes oclusivos. No caso de repelente para aplicação tópica, a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo (JENNING et al, 2000).

O estudo de nanoemulsões têm atraído considerável atenção no campo industrial, incluindo cosméticos, produtos farmacêuticos e agroquímicos. Estas emulsões são produzidas principalmente pelos sistemas modernos de emulsificação, como microfluidização e submicron resultando em emulsões que podem ter um alto potencial de aplicação em encapsulamento de ingredientes. Visto que a estabilidade e outras características da emulsão, tais como tamanho e distribuição das gotas desempenham um papel fundamental na retenção e teor de óleo na superfície do produto (JAFARI et al, 2007).

As preparações semi-sólidas cutâneas são formuladas de modo a promoverem a libertação local ou transdérmica das substâncias ativas; são igualmente utilizadas devido à sua ação emoliente ou protetora. Apresentam aspecto homogêneo e são constituídas por um excipiente, simples ou composto, no qual são dissolvidas ou dispersas uma ou várias substâncias ativas, sendo que a composição do excipiente pode ter influência na atividade da preparação. Os excipientes que se utilizam podem ser substâncias de origem natural ou sintética e podem ser monofásicos ou multifásicos. Deste modo, conforme a natureza do excipiente, a preparação pode ter propriedades hidrófilas ou hidrófobas. Por outro lado, a

preparação pode conter outros excipientes apropriados, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes, espessantes e promotores da absorção. (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005)

A administração cutânea é uma via especialmente destinada à obtenção de uma ação tópica, mais ou menos profunda, e só em casos particulares se recorre a ela para se obter uma absorção sistêmica do fármaco. (OLIVEIRA, I 2009).

Formulações diferenciadas, como por exemplo, a microencapsulação e a nanoemulsão estão sendo desenvolvidas para reduzir a quantidade a ser aplicada, aumentar a duração da sua eficácia, reduzindo a sua volatilização, simplificar o manuseio de material e diminuir a taxa de degradação no meio ambiente.

2. Fundamentação teórica

2.1- Estudo fitoquímico Brasileiro

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. (PINTO, 2002).

Nos últimos anos tem se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter compostos com propriedades terapêuticas. Isso pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nessa área tanto em congressos, como em periódicos nacionais e internacionais. (CECHINEL FILHO, 1998).

Apesar desses avanços, a composição química e as atividades biológicas das substâncias isoladas de plantas ainda são pouco conhecidas e exploradas, principalmente das espécies brasileiras. Em 1987 foi estimado que de um total de aproximadamente 60 mil espécies, somente 880 possuíam algum estudo fitoquímico realizado (Ribeiro, 1987). Mesmo que este levantamento reflète dados de mais de 15 anos atrás, na última década, não houve uma mudança abrupta no conhecimento da composição química da flora brasileira. Recentemente, um grupo de pesquisadores efetuou um levantamento a respeito da química e farmacologia das substâncias e extratos das espécies vegetais de ocorrência na caatinga brasileira. Os resultados deste levantamento indicaram que houve pouco progresso no conhecimento químico

e biológico das espécies vegetais brasileiras. Dentre as 1981 plantas da caatinga descritas no Herbário do Departamento de Biologia da UEFS, distribuídas em 84 famílias, somente cerca de 10 % delas possuíam algum tipo de estudo químico. E somente 10 espécies possuíam estudos químicos e farmacológicos sistemáticos e definitivos (David et al, 2002). Estes dados são mais um indício de que só recentemente a comunidade científica tem intensificado estudos interdisciplinares, no intuito de testar biologicamente as substâncias isoladas.

2.2- Testes biológicos

Uma grande área de estudo dos vegetais brasileiros e, principalmente baianos, são os compostos com propriedades antioxidantes, estas substâncias presentes na matéria prima vegetal são utilizados para proteção de cosméticos, medicamentos e alimentos contra a decomposição oxidativa. Tem sido demonstrado em diversos experimentos, que enzimas e metabólitos presentes em plantas superiores (principalmente fenólicos) se protegem da ação oxidante através da inibição da formação de radicais livres e pelo seqüestro dessas espécies oxigenadas, como exemplo, os radicais peróxidos. (ANDERSON et al., 1991). Um outro aspecto é que a descoberta de novas substâncias, de origem vegetal, com atividade antioxidante pode vir a ter grande interesse científico e farmacêutico. Atualmente, sabe-se que existe uma correlação entre esta atividade e a propriedade que alguns antioxidantes apresentam de inibir o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (FAURÉ et al, 1990; Ho et al., 1994).

Grandes companhias farmacêuticas aliadas a Instituições de pesquisas de países desenvolvidos têm grande interesse na busca de novas drogas anticancerígenas a partir de fontes naturais (BALICK et al., 1996). A utilização de *Artemia salina* como pré-*screen* de anticancerígenos, pode ser considerada como um indicador confiável quanto a toxicidade de substâncias que se encontram nos extratos orgânicos testados. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos, com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas, entre o teste de letalidade do camarão e testes *in vitro* efetuados com

linhagens de células cancerígenas (MEYER et al., 1990, ANDERSON et al, 1991). Ficou demonstrado que o teste com A. salina é tão acurado quanto os testes realizados com células cancerígenas, proporcionando assim um meio para seleção de extratos que devam ser estudados para obtenção de novas substâncias citotóxicas.

Deste modo, somente as substâncias puras, após elucidação estrutural, seriam submetidas à avaliação in vitro da citotoxicidade, diminuindo-se custos e permitindo que laboratórios químicos e biológicos trabalhassem com busca de novas substâncias com atividade citotóxica. O protocolo do Método está descrito em Baker et al., 1995.

2.3- Relevância clínica do estudo de antioxidantes de origem vegetal.

Nos últimos anos, evidências crescentes indicam que vários estados patológicos como artrites reumáticas, asma, câncer, arteriosclerose, inflamações intestinais, doenças degenerativas do sistema nervoso central, mal de Alzheimer, e mal de Parkinson estão associados em parte com os efeitos deletérios que o desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes (estresse oxidativo) e a produção descontrolada de radicais livres pode provocar nos sistemas biológicos (Cuzzocrea, 2001; Müller, 1992). A busca por agentes capazes de interferir nos mecanismos de envelhecimento celular e consequente desenvolvimento de diversas enfermidades correlacionadas passou a ser uma das prioridades nos setores médico e farmacêutico impulsionando esforços científicos nas áreas de química e farmacologia de produtos naturais (Middleton, 2000). A doença de Alzheimer afeta aproximadamente 4 milhões de pessoas unicamente nos Estados Unidos sendo responsável pela maioria dos casos de demência na terceira idade (Hostettmann, 2003). Esta doença encontra-se associada com déficits dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (Bryne, 1998). Portanto a restauração da função colinérgica é a primeira etapa no tratamento sintomático da doença de Alzheimer. Assim, inibidores da colinesterase, os quais aumentam a função colinérgica central, são utilizados no tratamento desta doença (Perry, 1999).

Em função das poucas alternativas de medicamentos utilizados no tratamento do mal de Alzheimer, há um grande interesse pela descoberta de novos fármacos, principalmente os de origem natural, que possam ser utilizados no tratamento desta doença ou mesmo que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os ácidos triterpênicos tais como ácido betulínico e oleanólico são substâncias que ocorrem no reino vegetal e que têm atividades biológicas conhecidas importantes. No Japão, por exemplo, são usados na terapia de câncer da pele e as preparações contendo os dois são também recomendadas para evitar o surgimento de melanomas. Além disso, o ácido betulínico apresenta atividade anti-HIV em células linfócitas H9.

Estes ácidos terpenicos também são empregados em cremes e cosméticos, pois melhoram a saúde da pele e do cabelo, formando uma barreira de proteção contra agressões externas. Desta forma, melhoram a elasticidade da pele e restauram as fibras de colágeno, além de atenuarem as linhas de expressões, rugas e manchas na pele. Apesar destes usos, estas substâncias são obtidas comercialmente através de fontes naturais, pois, a síntese total torna inviável economicamente.

2.4- Nanotecnologia

Um dos setores da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carreamento e liberação de fármacos e vacinas para melhorar a sua eficácia terapêutica.

O desenvolvimento de sistemas nanocarreadores pode ser considerado uma interessante abordagem para explorar as propriedades deste composto na clínica. Carreadores coloidais diferem entre si em função da sua composição, capacidade de incorporar fármacos e aplicabilidade, mas a característica comum é o tamanho submicrométrico de partícula. Entre os carreadores nanoestruturados com potencial aplicação tópica destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), as nanoemulsões (NE) e as microemulsões (ME). Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por lipídios altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos

apresentando tamanho de partícula variável. Entre suas principais características incluem excelente estabilidade física.

2.5- Potencial Zeta

Nas nanoemulsões, as minúsculas dimensões das gotículas reduzem muito a força da gravidade, evitando que haja a criação de sedimentos durante o armazenamento do produto. O pequeno tamanho das gotículas também evita a floculação. Evitando a floculação, o sistema mantém-se disperso, sem separação. As gotículas também evitam a coalescência por não serem deformáveis e não apresentarem alterações da superfície (NEVES, 2008). Uma forma de investigar a relativa estabilidade coloidal dessas partículas é determinar o Potencial Zeta das mesmas que, dependendo da sua intensidade, pode contribuir significativamente nos processos de agregação ou não agregação (Maron et al, 2007).

A presença de uma carga superficial em partículas suspensas num líquido afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula, ou seja, na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão. O efeito resultante é o acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. Esses íons acabam formando uma “camada elétrica” que reveste a partícula e a mesma é dividida em duas partes: uma camada interna, onde os íons estão fortemente ligados à partícula, e uma camada externa, onde os íons se difundem e estão fracamente ligados. A camada externa representa uma barreira de proteção dentro da qual a partícula e os íons formam uma entidade com relativa estabilidade iônica. Quando a partícula difunde no líquido, sob ação de uma diferença de potencial na ordem de 150 V, os íons contidos dentro dessa barreira se difundem juntamente com a partícula, o que não acontece com os íons externos à barreira. O potencial que existe nesta barreira é denominado de potencial eletrocinético, mais conhecido como Potencial Zeta. (Maron et al, 2007)

Potencial Zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada externa. A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão considerando que, se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo de Potencial Zeta,

elas irão repelir umas às outras evitando a agregação. No caso de valores de Potencial Zeta muito baixos, próximos à zero, a ausência de carga superficial pode favorecer, em alguns casos, interações entre partículas o que promove processos de floculação ou agregação.

Quando um equilíbrio de forças é estabelecido, as partículas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta com velocidade constante. Essa velocidade da partícula num campo elétrico é denominada de mobilidade eletroforética e, a mesma depende da potência do campo elétrico, da constante dielétrica do meio, da viscosidade do meio e do Potencial Zeta. (Maron et al, 2007).

Desta forma, o Potencial Zeta de partículas em suspensão é obtido pela aplicação da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

onde U_E é a mobilidade eletroforética, ε a constante dielétrica, ζ o Potencial Zeta, η a viscosidade e $f(ka)$ a função de Henry. Valores aproximados de 1,5 ou 1,0 são assumidos para a função de Henry. Basicamente, nas determinações de Potencial Zeta em meio aquoso de moderada concentração de eletrólito, o valor de 1,5 é empregado. Nesta condição considera-se o modelo de Smoluchowski com partículas de tamanhos em torno de 200 nm ou mais, dispersas em eletrólitos contendo uma concentração de sal maior de que 10^{-3} M. Para partículas menores, dispersas num meio de baixa constante dielétrica (geralmente meios não aquosos), o valor de 1,0 é utilizado e o mesmo refere-se à aproximação de Huckel. (Maron et al, 2007).

2.6- Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Outra forma de avaliar a distribuição dos tamanhos das partículas é o espalhamento de luz dinâmico ou DLS, uma das estratégias para determinação do coeficiente de difusão (D) e raio hidrodinâmico (R_h) de uma partícula é o espalhamento de luz dinâmico (DLS).

No DLS uma radiação eletromagnética conhecida é emitida sobre uma solução de amostra com diluição infinita. Ao atingir as partículas ocorre uma

mudança do vetor elétrico da luz emitida que provoca o espalhamento da luz, sendo este proporcional à concentração de partículas e ao tamanho destas, uma vez que partículas menores espalham mais a luz em menores ângulos, e partículas maiores em maiores ângulos, a observação da luz espalhada normalmente é feita a 90 °. A intensidade de luz espalhada varia com o movimento Browniano das partículas, sendo inversamente proporcional ao tamanho destas, assim partículas menores apresentam uma maior frequência de variação da luz espalhada do que partículas maiores. Essa movimentação das partículas na solução é determinada como coeficiente de difusão e é inversamente proporcional ao R_h das partículas. (BERNE e PECORA, 2000; CHU, 2007).

2.7- Lipossomas

Os lipossomas são estruturas que apresentam grande similaridades com as membranas biológicas. As bicamadas lipídicas dos lipossomas no laboratório são facilmente formadas, agitando-se com alta frequência os fosfolipídios em suspensões aquosas, um processo que resulta na formação dos lipossomas, vesículas fechadas, formadas por uma bicamada contínua de fosfolipídios (Lehninger *et al.*, 2000).

Tais bicamadas e os lipossomas têm sido estudados intensamente, pois suas propriedades são muito semelhantes àquelas das membranas naturais. Por exemplo, as bicamadas de fosfolipídios e as membranas naturais possuem alta resistência elétrica; elas permitem que a água passe facilmente, mas não permitem a passagem de cátions ou ânions.

As bicamadas são estruturas mais rígidas que as micelas, embora ambos sejam sistemas altamente dinâmicos, havendo constantes intercâmbios entre os monômeros fosfolipídicos em solução e aqueles que fazem parte da estrutura. Esta rigidez pode ser avaliada pelo tempo de troca de monômeros entre os agregados e a solução, que é da ordem de milisegundos para micelas e várias horas para bicamadas de fosfolipídio. (Ridout *et al.*, 1988).

A partir dos resultados químicos, das evidências da microscopia eletrônica e da semelhança nas propriedades das membranas naturais com as bicamadas de

fosfolipídios sintéticos, Singer e Nicholson (1972) postularam uma teoria unificadora da estrutura de membrana chamada de modelo do mosaico fluido. De acordo com o modelo de mosaico-fluido de Singer e Nicholson, a matriz da membrana biológica é uma bicamada de glicofosfolipídios na qual proteínas estão incorporadas em sua superfície ou em seu interior (Singer e Nicholson, 1972).

Uma vantagem da aplicação de sistemas lipossomados, com relação a outros sistemas transportadores de fármacos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais. Além disso, são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. (Frézardet al., 2005). Os lipossomos possuem a capacidade de encapsular moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso e moléculas hidrofóbicas na região apolar das bicamadas e liberar estas moléculas dentro de determinadas condições ambientais e energéticas.

A importância no desenvolvimento de formulações cosméticas em cremes ou outras formulações baseia-se no fato que raramente os ativos são administrados isoladamente, sendo frequentemente inseridos em uma formulação, combinados com diversas substâncias inativas denominadas adjuvantes cosméticos ou excipientes (ANSEL, 2007). A variação destes adjuvantes produz formas cosméticas variadas, desde simples soluções até sistemas de liberação complexa (AULTON, 2005).

2.8- Formulação Galênica

As formas de apresentação dos cosméticos são fundamentais para a atividade das substâncias ativas uma vez que é responsável por conferir peso, volume e consistência apropriada ao cosmético, proporcionar a precisão na dose do ativo, aumentar ou preservar a estabilidade físico-química e microbiológica dos componentes ativos, promover perfis diferenciados de liberação, facilitar a adesão ao tratamento, dentre outros (Ferreira, 2008).

As formas cosméticas básicas, desprovidas de atividade estética, são

conhecidas como bases galênicas. São preparações compostas de uma ou mais matérias-primas, com fórmula definida, destinadas a serem utilizadas como veículos de preparações farmacêuticas e ou cosméticas (ANVISA, 2007)

As emulsões são muito utilizadas como bases galênicas para incorporação de ativos em cosméticos. São formas que apresentam boa aceitação pelo consumidor, pois não são gordurosas, são de fácil aplicação e apresentam fácil espalhamento. Uma emulsão é um sistema termodinamicamente instável sendo, portanto necessário no desenvolvimento de sistemas emulsionados o estudo de sua estabilidade (Alves, 1999).

Uma nova formulação desenvolvida deverá ter estabilidade, que é a capacidade que o produto tem num determinado período de tempo, do início ao final de sua vida útil, e numa embalagem determinada, de manter as suas propriedades e características que apresentava no momento em que finalizou a sua fabricação através de um procedimento padronizado (D`León, 2001).

2.9- Estabilidade de formulações

Pelo perfil de estabilidade de um produto é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor. O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade.

O estudo de estabilidade é um indicativo de que não ocorrerão problemas nas formulações no decorrer do tempo de armazenamento e durante o uso do produto pelo consumidor. Para a obtenção do sucesso estético, a forma cosmética deve apresentar-se estável, o que torna a avaliação de sua estabilidade um fator fundamental para os produtos.

3. Objetivos

Obter de formulações contendo nano e micro cápsulas a partir de ácidos triterpênicos encontrados em plantas do semi-árido baiano dos gêneros *Eriope* que

são endêmicas na Bahia.

Objetivos Específicos

1. Obter os sistemas nano e micro encapsulados de ácidos triterpênicos;
2. Avaliar as características morfológicas nano e micro esferas contendo os bioativos;
3. Realizar estudos de pré-formulação de bases galênicas para associação com os ácidos triterpênicos e seus sistemas encapsulados;
4. Desenvolver formas galênicas de uso externo contendo os derivados vegetais;
5. Avaliar as formas galênicas de uso externo contendo os bioativos e seus sistemas carreadores.

4. Metodologia

4.1. Obtenção dos ácidos triterpênicos

Os ácidos triterpênicos foram cedidos pela Professora Juceni Pereira de Lima David, os quais foram isolados de plantas do gênero *Eriope*.

Após a coleta das folhas e caule, foram secados em estufa a 40°C com ventilação, moído (moedor tipo TECNAL) e submetidas à maceração por 48 horas por quatro vezes consecutivas em metanol. O extrato metanólico bruto obtido após concentração no evaporador rotatório, foi particionado com hexano e em seguida com clorofórmio. Secados e obtidos a massa.

4.2. Obtenção dos sistemas nano e micro encapsulados de ácidos triterpênicos

Os lipossomas foram obtidos pela técnica de extrusão constituído de duas seringas tipo *luer lock* de capacidade para 60mL acopladas a um conector, a partir da aplicação de pressão por meio de seringas conectadas.(Figura 2). Preparou-se uma fase oleosa (microemulsão) contendo lecitina de soja granulada, palmitato de Isopropila e ácido sorbico nas quantidades de 50g, 50g e 1g, respectivamente. Em 20 ml desta fase adicionou-se 4,4 ml de ácidos triterpênicos (ácido betulínico e oleanólico) chegando a concentração de 5% de (Fase oleosa). A fase aquosa

composta de 10g de Hidroximetilpropilcelulose (HPMC), 0,1g de Sorbato de potássio e quantidade suficiente de água destilada para 50mL. (WILLIMANN et al; 1992 - ADAPTADO).



Figura 2 – Sistema de extrusão: seringas conectadas

A fase aquosa foi transferida para uma seringa tipo *luer lock* com capacidade para 60mL e a fase oleosa acondicionada em outra seringa com as mesmas especificações. As seringas foram acopladas com auxílio de um conector formando um ângulo de 90 graus. Foi aplicada, alternadamente, uma pressão manual nos êmbolos das seringas para a incorporação das fases. Este procedimento foi reproduzido 110 vezes, até total homogeneização. O sistema obtido foi mantido sob-refrigeração (10 °C) (JONES, 2003 – ADAPTADO).

As amostras foram filtradas a 0,45 μ m e armazenadas em Eppendorfs.a temperatura ambiente (Figura 3).

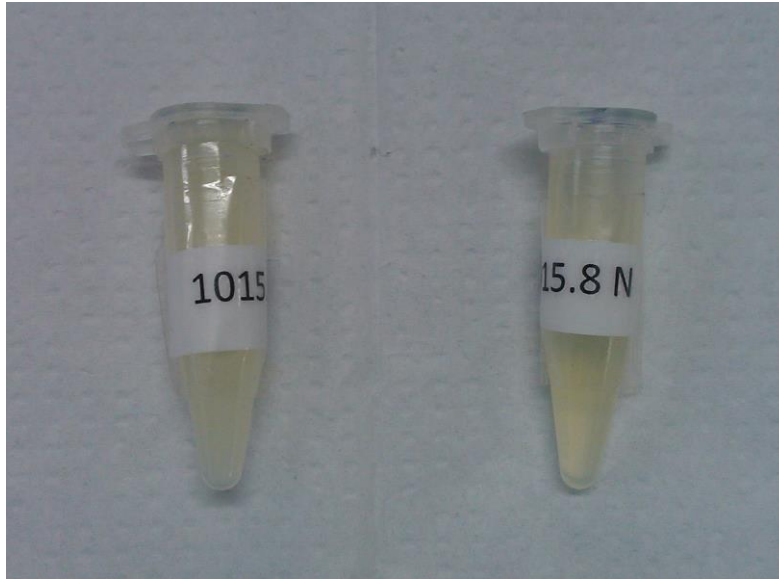


Figura 3 – Eppendorfs com amostras dos lipossomas.

4.3. Avaliação dos sistemas nano e micro encapsulados de ácidos triterpênicos

4.3.1. Potencial Zeta

Para a realização deste trabalho, as medidas foram feitas em triplicata, alíquotas diluídas cerca de 250 vezes, empregando-se o Zetatrac (Micotrac), na temperatura de 25°C. Com a medida do Potencial Zeta pode-se estimar a estabilidade das dispersões coloidais.

4.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico(DLS)

Todas as amostras foram filtradas com filtro de membrana 0,45 µm de porosidade para dentro de cubetas óticas. No Centro de tecnologias do Nordeste (CETENE), as amostras foram então analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ($\lambda_0 = 632,8$ nm) como fonte de radiação. Para os experimentos de DLS, o volume de espalhamento detectado pelo detector foi minimizado com uma abertura de 0,4 mm, e também utilizou-se um filtro de interferência entre o porta-amostras e a detecção do sinal na fotomultiplicadora. A

luz espalhada foi coletada a um ângulo de 90° entre a radiação incidente na amostra e a radiação espalhada detectada (luz espalhada pelas partículas). As funções de correlação temporal foram obtidas em um modo denominado multi- τ , usando-se 66 canais e analisadas utilizando-se o método dos cumulantes, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (software Bookhaven Instruments). As medidas de intensidade de luz espalhada (I_s) em função da temperatura foram realizadas utilizando-se um banho externo acoplado, o qual permite variar a temperatura numa faixa de 15 a 75° C. Dessa forma, as amostras de lipossomas foram aquecidas de 15 a 75° C seguindo uma rampa de 1° C/min com intervalos de 10 minutos a cada 2° C. As medidas foram obtidas no ângulo de 135° , para maximizar a contribuição da bicamada lipídica na luz espalhada.

A amostra de lipossomas dos ácidos triterpênicos (solução aquosa a 1%) foi submetida sem diluições a medida de espalhamento dinâmico de luz utilizando-se o equipamento Zetatrac (Micotrac) A amostra foi introduzida em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram realizadas à temperatura ambiente de 25° C. O equipamento possui dois lasers de diodo de 5 mW operando num comprimento de onda de 780 nm.

4.3.3. Microscopia óptica

As amostras foram preparadas a temperatura ambiente e filtrados a $0,45\ \mu\text{m}$, uma pequena alíquota de cada amostra concentrada foi depositada sobre uma lâmina de vidro apropriada de 10×3 cm, uma porção considerável de água MilliQ foi adicionada para dispersão da amostra e uma outra lâmina foi sobreposta. Analisados em Microscópio óptico Olympus BX-43 e fotografados com câmera Olympus PM20.

4.4. Obtenção das formulações galênicas: Emulsão e gel

4.4.1. Preparo da emulsão

4.4.1.1. Formulação de emulsão O/A

Fase oleosa:

Cera autoemulsionante 15 g

Vaselina líquida 2 g

Propilparabeno 0,015 g

Fase aquosa:

Propilenoglicol 2g

Metilparabeno 0.05 g

Água destilada q.s.p. 100 g

4.4.1.2. Técnica de preparo da emulsão

Para o preparo da fase aquosa, o metilparabeno foi pesado, adicionado em 60 mL de água destilada e levado para aquecimento em Becker de vidro (200 mL) até 80°C.

Para o preparo da fase oleosa, o álcool cetílico + estearato de glicerila + estearato de PEG75 + Ceteth20 + Esteareth20 (Emulium Delta), o propilparabeno e a vaselina líquida foram pesados separadamente. Posteriormente foram acondicionados em um outro Becker de vidro (200mL), previamente tarado, e levados para aquecimento até 75°C.

A fase aquosa (a 80°C) foi vertida sobre a fase oleosa (a 75°C), sob agitação constante e vigorosa. A agitação da preparação foi mantida até a temperatura ambiente.

4.4.2. Preparo do gel

4.4.2.1 Formulação do gel

Carbômero ácido 1g

Metilparabeno 0,005g

Trietanolamina 0,6g

Água destilada q.s.p. 100g

4.4.2.2 Técnica de preparo do gel

Para o preparo do gel, é homogeneizado o metilparabeno na água previamente medida, então é polvilhado o carbomêro sobre a água destilada em repouso. Após total hidratação do carbomêro ácido, adiciona-se a trietanolamina, só então são agitados com auxílio de um mixer vigorosamente. Observa-se a formação da estrutura gelificada.

4.5. Veiculações das nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos nas formulações galênicas (emulsão e gel)

As nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos foram incorporadas às formulações galênicas pela técnica de espatulação, até total homogeneidade do sistema, então acondicionados em recipientes plásticos, brancos e opacos, para posteriores análises. (Figura 4)



Figura 4 – Técnica de espatulação em placa de vidro polido.

4.6. Avaliação das formulações galênicas

4.6.1 Características Organolépticas

Os caracteres organolépticos constituem o indicativo mais acessível para se avaliar a qualidade de uma preparação semi-sólida e para detectar alterações. O simples exame visual pode funcionar como um indicativo, por vezes perfeito, da

homogeneidade da preparação. (OLIVEIRA, 2009). As formulações foram avaliadas quanto a cor, odor e aspecto.

4.6.2 Avaliação do pH

Para a determinação do pH, as amostras foram retiradas uma alíquota de 5 gramas. Em seguida levou-se essa solução ao pHmetro Micronal – Mod. B-474, de forma a obter o pH característico da formulação.

4.6.3 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

As amostras são centrifugadas a temperatura ambiente 25°C, durante 30 minutos a 3000 rpm e depois são analisadas, visualmente.

4.6.4. Avaliação do poder de humectancia

Analisar o poder de retenção da água apresentado pelas formulações e relacioná-lo com a presença das nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos (ácido betulínico e ácido oleanólico). Uma das formas para fazê-lo é através da determinação da perda de massa, atribuída à evaporação de água da fórmula.

Foi retirada uma alíquota de 2 gramas de cada amostra, em uma placa de petri a temperatura ambiente, foram efetuadas pesagens diárias durante 50 dias, anotando as respectivas massas, até estabilização do peso.

4.6.5. Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade baseia-se na metodologia em que a resistência ao movimento forçado é determinada por um dispositivo de espalhabilidade. O dispositivo é formado por uma placa suporte de vidro (20 cm x 10 cm x 0,03cm) com uma folha de papel milimetrado embaixo, onde foi colocado dentro de um círculo com 1cm de diâmetro pré marcados sobre a placa de vidro. A placa molde foi

cuidadosamente retirada e sobre a amostra colocada uma placa de vidro e sobre esta um peso pré-determinado (500g) por 5 minutos e após medição do diâmetro formado. Este procedimento foi realizado em triplicata, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida. (BACHHAV, 2009 – Adaptado).

4.6.6. Determinação da atividade antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante do sistema lipossomado de ácidos triterpênicos foi utilizado o método de sequestro de radicais livres por DPPH descrito em Sousa, 2007; em espectrofotômetro de microplaca (BioRAD) com incubação a 25°C. A leitura foi efetuada em comprimento de onda de 490 e 630nm para avaliação da linearidade da ação anti-radicalar e seu potencial antioxidante.

Solubilizou 2,5g do sistema lipossomado de ácidos triterpênicos em metanol que resultaram em concentrações de, 10; 5; 2,5 e 1,25 mg/ml. Soluções metanolicas de ácidos triterpênicos foram utilizadas como controle para a comparação dos resultados.

A placa de leitura foi dividida em 4 colunas com 7 linhas. As amostras foram distribuídas nas linhas da placa da seguinte maneira: ácidos triterpênicos, sistema lipossomado de ácidos triterpênicos e o padrão Butilhidroxitolueno (BHT). Nas colunas da placa representaram as concentrações das soluções metanolicas, e nas linhas, as amostras.

Foi feita uma solução de DPPH 0,04% e adicionada nas cavidades da microplaca. As determinações foram realizadas adicionando-se a cada poço da microplaca 250 µL da solução de DPPH• e 50 µL de metanol para o controle, padrão (BHT) e amostras. As leituras das absorbâncias foram realizadas no tempo 0min e 30min, em espectrofotômetro de microplaca (BioRAD) com incubação a 25°C onde é observado o decaimento da absorbância da amostra. As análises foram realizadas em triplicatas.

5. Resultados e Discussão

5.1 Potencial Zeta

Os comportamentos eletrocinéticos de partículas em suspensão constituem uma propriedade dinâmica das partículas como resposta à ação de um campo elétrico aplicado. A presença de cargas na superfície externa e a sua magnitude influenciam os processos dinâmicos das estruturas na suspensão. (MERTINS, 2008). Em geral, a agregação de partículas eletricamente carregadas é menos provável do que as não carregadas devido à repulsão eletrostática.

Os resultados obtidos para as vesículas filtradas a 0,45 μm , para o Potencial Zeta foi de $-8,52 \pm 3$ mV. O valor negativo significa que as vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, onde os íons K^+ da suspensão estão sendo atraídos pela carga superficial negativa dos lipossomas.

No caso de valores de Potencial Zeta muito baixos, próximos à zero, a ausência de carga superficial pode favorecer, em alguns casos, interações entre partículas o que promove processos de floculação ou agregação. De forma geral, a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis é considerada como sendo o valor de Potencial Zeta de ± 30 mV. Sendo assim, suspensões com valores acima de +30 mV, bem como com valores inferiores a -30 mV são consideradas estáveis. Já as suspensões com valores entre -30 e +30 mV são instáveis, sendo o valor de 0 mV como o de maior instabilidade, o chamado ponto isoelétrico. Evidentemente essa não é uma regra, considerando que partículas também podem ser preparadas com materiais que proporcionam um impedimento estérico que desfavorece fenômenos de agregação. Assim, as especificidades de cada sistema devem ser avaliadas para conclusões a respeito de estabilidade. (Gonçalves, 2008).

Um valor de Potencial Zeta de -8,52 mV, pode ser considerado como um valor crítico, pois está acima do limite inferior (-30 mV) definido como potencial de colóides de estabilidade moderada, ou seja, o valor encontra-se dentro da faixa de -30 a +30 mV, onde os fenômenos de agregação são mais frequentes. (Zetasizer Nano Series, 2004.).

O valor de $-8,52 \pm 3$ mV significa que os lipossomas podem apresentar relativa estabilidade coloidal em relação a processos de agregação. A carga superficial negativa proporciona pouca proteção iônica às partículas, devido a proximidade do 0mV, porém a presença de um tenso ativo na formulação dos lipossomas contribui para que uma partícula em difusão encontrar outra na suspensão, e então se auto-repelirão devido à carga superficial e ao surfactante.

5.2 Espalhamento de luz Dinâmico (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica não invasiva para a medição do tamanho de partículas, tipicamente com tamanho menor de 1 μm . Partículas em suspensão apresentam um movimento denominado browniano. Se essas partículas são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento da luz. A intensidade da luz espalhada, detectada num ângulo determinado, varia numa taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho. Dados do tamanho da partícula podem ser gerados a partir da análise da variação na intensidade da luz espalhada (PECORA, 1985).

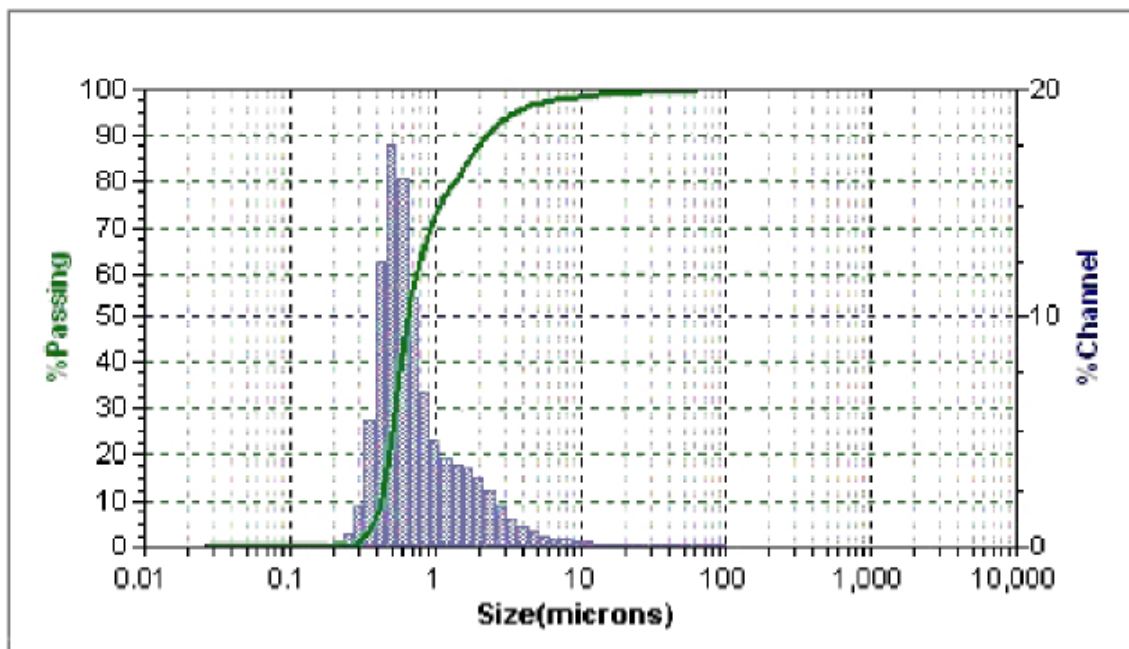


Figura 5 - Gráfico da distribuição do tamanho de partícula do lipossoma de ácidos triterpênicos (solução aquosa à 1%) por espalhamento dinâmico de luz.

Tabela 1 – Percentuais da distribuição dos tamanhos das partículas de lipossomas contendo ácidos triterpênicos.

Percentagem (%)	Tamanho (μm)
10	0,423
20	0,483
30	0,535
40	0,590
50	0,654
60	0,748
70	0,923
80	1,369
90	2,300
95	3,58

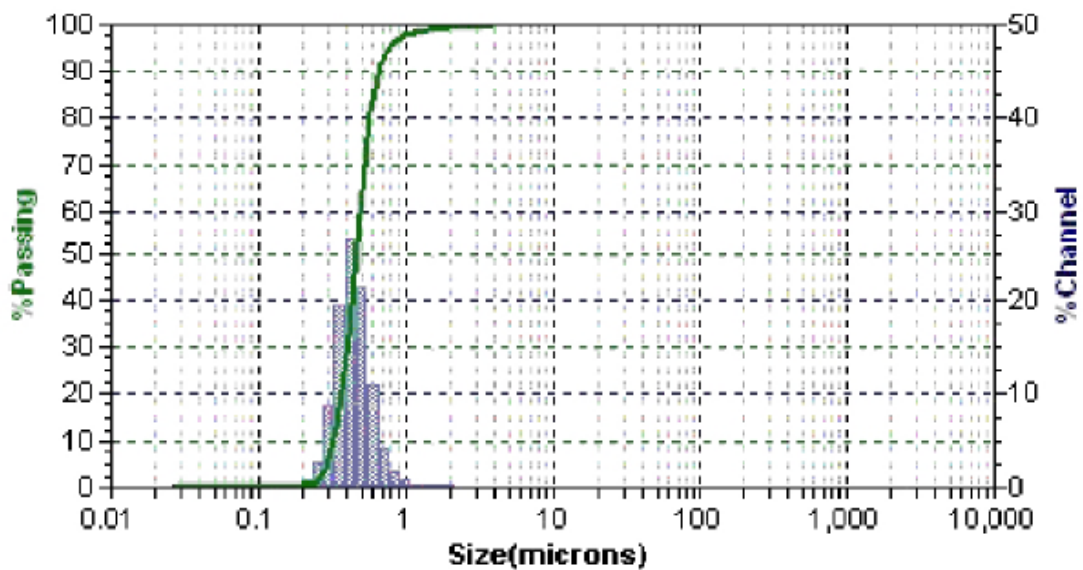


Figura 6 - Gráfico da distribuição do tamanho de partícula do lipossoma puro (solução aquosa à 1%) por espalhamento dinâmico de luz.

Tabela 2 – Percentuais da distribuição dos tamanhos das partículas de lipossomas puros.

Percentagem (%)	Tamanho (μm)
10	0,330
20	0,370
30	0,401
40	0,430
50	0,457
60	0,488
70	0,525
80	0,573
90	0,659
95	0,767

Observando os resultados, identificou-se que os tamanhos das partículas se encontram próximos a $1\mu\text{m}$, tanto para os lipossomas contendo ácidos triterpênicos quanto para os puros (Figura 6), porém as amostras de lipossomas puros apresentam 95% de suas partículas de tamanhos menores que $1\mu\text{m}$ (Tabela 2) contra aproximadamente 70% dos lipossomas que contém os ácidos (Tabela 1). Este fato pode ser devido à encapsulação dos ácidos triterpênicos, por conseguinte um aumento do volume médio das partículas. Tal fato é positivo, pois é perceptível o maior número de partículas está dentro da escala nanométrica.

5.3 Microscopia óptica

A microscopia óptica foi empregada para uma avaliação microscópica das vesículas estudadas através de um microscópio óptico convencional. Numa análise preliminar de lipossomas foi utilizado um Olympus BX-43 sob luz normal, para observação direta, e sob luz polarizada. O microscópio dispõe de objetivas de 10X e 40X. As imagens foram registradas através de uma câmera fotográfica (Olympus PM20), com controlador de tempo de exposição, acoplada ao microscópio.

A fim de preservar as características morfológicas e físico químicas as amostras foram armazenadas sob refrigeração e então analisadas em microscópio óptico em um aumento de 40 vezes. Foi observada a formação de vesículas forma circular com superfície topográfica acentuada e diâmetro médio de 0,654 μm (Figura 7). Como os atributos dos lipossomas em sistemas *in vitro* e *in vivo* são fortemente condicionadas a seu tamanho médio e a homogeneidade das formulações lipossomal, estas foram determinados como controle de qualidade da produção.

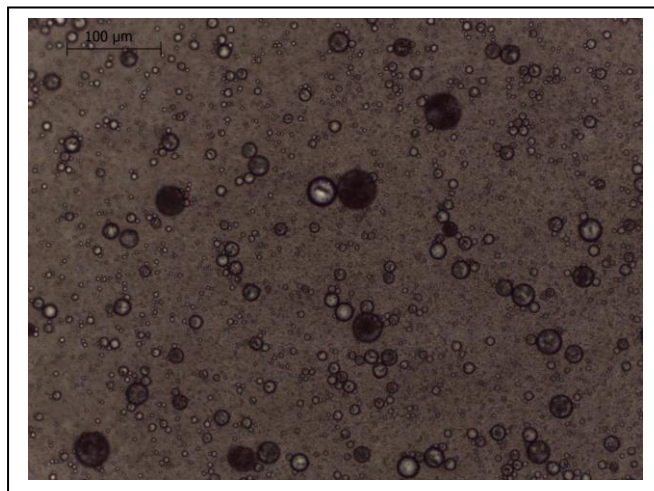


Figura 7 - Fotomicrografia dos Lipossomas contendo Ácidos Triterpênicos em um aumento de 40 vezes.

A imagem revela uma homogeneidade do diâmetro das vesículas. Estes lipossomas após serem depositados sobre a placa apresentaram uma morfologia tipo esferas, aparentemente, estruturas achatadas, porém é visualizado um volume no seu interior, observando também a ocorrência de bicamadas e/ou monocamadas lipídicas.

O tamanho das vesículas bem como a sua distribuição em cada preparação é de grande relevância, pois afeta de forma direta a biodistribuição e o tempo de circulação dos lipossomas, assim como seu processo de captura pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). A velocidade de liberação do princípio ativo pode ser controlada pela manipulação tanto da composição da membrana (influenciando a velocidade de degradação dos lipossomas) quanto do tamanho dos

lipossomas. Assim, lipossomas pequenos são capturados com menor eficiência que lipossomas grandes e apresentam uma liberação mais prolongada (FRÉZARD *et al.*, 2005).

5.4 Veiculações das nano e microcápsulas de ácidos triterpênicos nas formulações galênicas (emulsão e gel)

A técnica de espatulação produziu uma emulsão e um gel homogêneos e uniformes, para o melhor desempenho das avaliações posteriores

5.5 Características organolépticas

Relativamente às características organolépticas verificou-se que quanto a cor a adição dos lipossomas de ácidos triterpênicos modificaram as características iniciais, amarelando a emulsão e tornando o gel opaco. Assim também a adição do sistema lipossomado alterou o odor das formulações para característico. Quanto ao aspecto em todos observamos total homogeneidade (Tabela 3).

Tabela 3 – Características organolépticas das formulações galênicas contendo ou não lipossomas de ácidos triterpênicos (LAT) no tempo 0 dias.

	Cor	Odor	Aspecto
Emulsão sem LAT*	Branco	Inodoro	Homogêneo
Emulsão com LAT*	Amarelado	Característico	Homogêneo
Gel sem LAT*	Incolor	Inodoro	Homogêneo
Gel com LAT*	Branco	Característico	Homogêneo

*LAT – Lipossomas de ácidos triterpênicos

5.6 Avaliação do pH

A determinação do pH de uma preparação para aplicação cutânea constitui um parâmetro extremamente importante, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica. A pele tem normalmente um pH médio de 5,5, embora este valor possa variar ligeiramente

consoante as diferentes zonas do corpo. O pH natural da pele provém das secreções das glândulas apócrinas e endócrinas que conduzem à formação de uma película de proteção sobre toda a superfície cutânea, designada de filme hidrolipídico (OLIVEIRA, 2009).

Observando os resultados apresentados na Tabela 4, é perceptível que com a adição dos lipossomas o pH se aproxima do 5,5, encontrado na pele. Assim é permitido inferir que há ausência, ou pouca, interferência na fisiologia normal da pele, preservando o filme hidrolipídico e ajudando na penetração cutânea do sistema de liberação lipossomado de ácidos terpênicos.

Tabela 4 – Avaliação do pH das formulações galênicas contendo ou não LAT no tempo 0 dias.

	pH
Emulsão sem LAT	6,93
Emulsão com LAT	5,98
Gel sem LAT	7,02
Gel com LAT	6,20

*LAT – Lipossomas de ácidos triterpênicos

5.7 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação

As técnicas de envelhecimento utilizadas para avaliar a estabilidade dos produtos cosméticos têm de ser, muitas vezes, adaptadas ao tipo de amostra para que seja possível detectar quaisquer alterações nas características da preparação.

Interessa, por isso, realizar ensaios de estabilidade num curto espaço de tempo, pelo que se efetuam ensaios de estabilidade acelerada. Estes ensaios permitem aumentar a velocidade das alterações físicas e/ou químicas do produto e podem recorrer a diferentes métodos, tais como os testes mecânicos ou os que utilizam condições de temperatura e umidade exageradas.

No método de centrifugação, a força gravitacional atua sobre o produto, promovendo o movimento das suas partículas. A centrifugação gera estresse na preparação porque são criadas condições que simulam um aumento da força da

gravidade, o que permite antecipar possíveis alterações de estabilidade. Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos (*caking*), coalescência, entre outros. (Oliveira, 2009).

Observando a figura 8, pode-se inferir que mesmo com o estresse produzido pela centrifuga, não ocorreu à separação de fases caracterizando que os produtos são estáveis e viáveis.



Figura 8 - Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

5.8 Avaliação do poder de umectante

Foi realizada pesagens diárias das amostras, em placas de petri, sob temperatura ambiente e umidade do ar de 70% aproximadamente. Os resultados podem ser visualizados no gráfico abaixo:

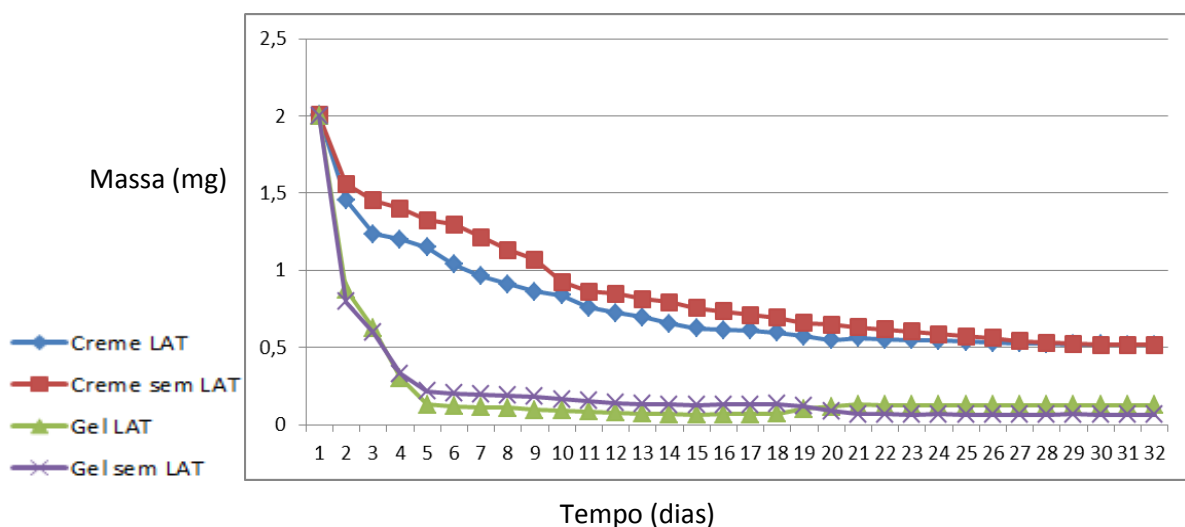


Figura 9 - Representação gráfica da perda de massa por evaporação de água.

Observando o gráfico pode se inferir que todas as formulações sofreram perda de massa durante o experimento, e só ao fim de 22 dias ocorreu uma estabilização do peso das amostras. As formulações a base de geles registaram perdas maiores, uma vez que contêm maior percentagem de água do que os cremes e, além disso, não têm um agente umectante na sua composição.

Pode verificar-se que parece haver influência do LAT na capacidade de retenção de água destas preparações, mesmo visualizando que praticamente os gráficos são sobreponíveis referentes a presença de LAT ou não, na mesma base galênica. As formulações com os lipossomas possuem suas linhas no gráfico sempre abaixo da preparação correspondente sem nano e microcápsulas, permitindo inferir que a perda de massa sempre irá ser menor, ou seja, a retenção de água na formulação será maior, ampliando o poder de umectância da formulação.

5.9 Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade baseia-se na resistência ao movimento forçado. Os resultados de espalhabilidade correspondem à relação entre a área de espalhamento conseguido com a aplicação de força sobre o produto e o esforço limite, relação esta que corresponde ao fator de espalhabilidade em mm²/g. Por esforço limite entende-se o peso em gramas das placas a partir do qual o produto não mais espalha mesmo quando se aplica mais esforço. (CZEPULA, 2006). Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de espalhabilidade em centímetros.

Formulação	Espalhabilidade (Diâmetro – 1cm) (cm)
Emulsão com LAT*	5,567
Emulsão sem LAT*	4,950
Gel com LAT*	5,083
Gel sem LAT*	5,083

*LAT – Lipossomas de ácidos triterpênicos

A partir dos valores, é perceptível que a emulsão com LAT possui uma característica de espalhabilidade melhor que todas as outras formulações, também é importante destacar que os dois geles apresentaram o mesmo valor, revelando que o lipossoma não influencia nas suas características de espalhabilidade, diferindo do que ocorreu nas emulsões.

5.10. Determinação da atividade antioxidante

O interesse do pesquisador por substâncias que tenham efeito antioxidante comprovado provém do fato que essas substâncias geralmente têm ação antienvhecimento e anti-inflamatórias, uma vez que protegem o tecido cutâneo de agressões geradas por radicais livres.

Em relação à avaliação da atividade antioxidante do sistema lipossomado, obtiveram-se inicialmente resultados que, após análises, foi verificada a ocorrência da proteção e estabilidade do potencial antioxidante nos sistemas. A quantidade de Lipossoma com ácidos triterpênicos necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, CE50, foi calculada a partir da equação da reta $y = 3,1x + 34,633$, obtendo-se um valor de 4,957 $\mu\text{g/mL}$.

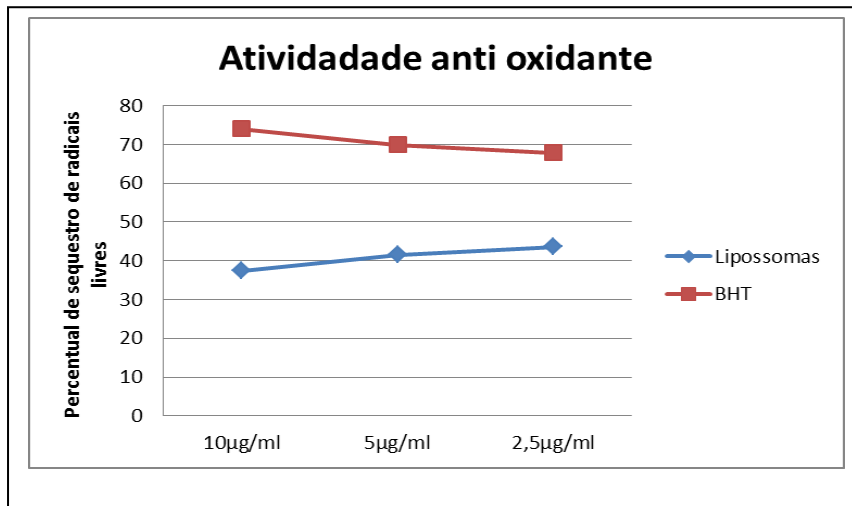


Figura 10 - Atividade antioxidante dos lipossomas contendo ácidos triterpênicos comparado ao padrão Butilhidroxitolueno (BHT).

Observou-se também a diferença na inclinação da reta pertencente ao sistema particulado (Figura 10), este evento demonstra a capacidade de proteção das moléculas de ácidos terpênicos por parte dos lipossomas, tornando-as mais biodisponíveis, dando efetividade e prolongamento da ação anti oxidante.

A capacidade de sequestrar o radical DPPH exibida pelas amostras em estudo está expressa em percentual de sequestro de radicais livres na figura 11.

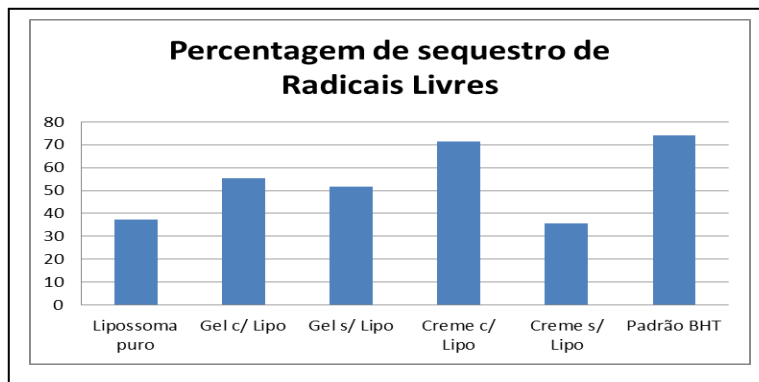


Figura 11 - Percentagem de sequestro de Radicais Livres pelas amostras de lipossomas veiculados ou não em diferentes bases galênicas.

Com base nesses resultados, todas as amostras possuem antioxidantes doadores de hidrogênio, que são capazes de neutralizar o radical DPPH, entretanto, esta ação é variada entre os cremes e géis. O controle positivo com BHT foi o que apresentou maior capacidade de sequestrar o radical livre, chegando a 74% de inibição do radical. Com relação às amostras, o creme com lipossoma de ácidos terpênicos foi o que apresentou melhor atividade antioxidante, seguida do Gel com o sistema de encapsulação, ambas com percentual de inibição superior a 50%. O Gel sem Lipossoma também se apresentou bastante eficaz, tendo um percentual superior a 50%.

A preservação do efeito sequestrador de radical livre dos lipossomas contendo ácidos triterpênicos é visualizado na figura 11, visto que todas as amostras possuem sua percentagem de sequestro em torno ou superior a 37,4%.

6 Considerações Finais

O presente trabalho demonstrou que os ácidos terpênicos de plantas do gênero *Eriope* constitui matéria prima capaz de ser transportadas em sistemas lipossomados.

A aplicação da nano e microencapsulação está cada vez sendo mais utilizada para melhorar produtos farmacêuticos e cosméticos. Esta dissertação obteve formulações galênicas contendo lipossomas de ácidos triterpênicos, as quais demonstraram viabilidade e eficácia.

Os sistemas lipossomados contendo os ácidos terpênicos apresentaram-se estáveis na escala micro e nanométricas, de distribuição e tamanho homogêneos e maleáveis, que pode facilitar a penetração de ativos de maior peso molecular nas membranas biológicas.

O pH das formulações encontram-se compatível com o da pele humana, o qual é uma inferência para estudos de produtos terapêuticos e/ou cosméticos. Possibilitando a sua utilização com finalidades tópicas.

Os ensaios de avaliação das bases galênicas evidenciaram que a emulsão com ácidos triterpênicos expressou os melhores resultados de espalhabilidade e umectancia, indicando ser o veículo mais adequado para o sistema. Assim concluiu-se que esta formulação galênica possui as melhores propriedades para a absorção e eficácia dos ativos encapsulados, além de apresentar a melhor biodisponibilidade e preservação da integridade da pele.

Já é conhecido que os ácidos terpênicos possuem atividade anti radical livre. Este efeito foi potencializado após o encapsulamento das moléculas e posterior incorporação em bases galênicas.

Os resultados nas bases galênicas creme e gel com lipossoma de ácidos terpênicos apresentaram a maior percentagem de inibição dos radicais livres. Portanto, a encapsulação de ácidos terpênicos apresenta-se como uma técnica considerada promissora para veiculação em produtos com finalidades farmacológicas e cosméticas.

Alternativas biotecnológicas para melhoramento de tratamentos e desenvolvimento de novos produtos cosméticos incluem compreensão das

tecnologias de encapsulamento, as quais são fundamentais para proteger e tornar mais eficazes os bioativos vegetais.

O presente trabalho gerou como produto um depósito de patente.

7. Referências

- ALVES, M. P. Formas Farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. 2006. 166 p. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre-RS.
- ANDERSON, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L.; Suffness, M. A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis** 2: 107-111, 1991.
- ANVISA. Notivisa - Sistema de Notificação em Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Disponível em: . Acesso em 10 set. 2007.
- ANSEL, H. C.; Popovich, N. G.; Allen JR.; L. V. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. .
- AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BACHHAV, Y. G.; Patravale, V. B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. Volume 365, Pag. 175–179, 2009.
- BAKER, J.T., Borris, R. P.; Carté, B.; Cordell, G. A.; Soerjato, D. D.; Cragg, G.; Gupta, M. P.; Iwu, M. M.; Madulid, D. R.; Tyler, V. E. Natural product drug discovery and development - new perspectives on international collaboration. *Journal of Natural Products* 58: 1325-1357, 1995.
- BALICK MJ, Elizabetsky E, Laird SA (1996) In *Medicinal Plant Resources of the Tropical Forest*, New York, Columbia
- BERNE, B. J. e Pecora, R. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. New York. 2000.
- CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim. Nova*, Vol. 21, Supl. 1, 1998.
- CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 671-675, 2004.
- CHU, Benjamin. *Laser light scattering: basic principles and practice*. Dover Publications. New York. 2007.
- CZEPULA, A. I. S. Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*) (asteraceae) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica in vivo. Dissertação de Mestrado. Itajaí: UVI. 2006.
- DAVID, J. P., Silva, E. F., Moura, D. L., Guedes, M. L. S., Assunção, R. de J., David, J. M. Lignanais e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. *Química Nova* 24: 730-734, 2001.
- DAVID, J. P.; Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M. Antioxidantes de Fontes Naturais. In: *Fitoterápicos Antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ed. Carvalho, J. C. T., São Paulo, Ed. Tecmed, p. 125-161, 2004.
- DAVID, J. P.; David, J. M. Plantas Medicinais. Fármacos derivados de Plantas. In: *Farmacologia*. Ed. Penildon Silva, 6ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p.134-145, 2002

- D'LEON, L.F.P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. *Cosmetics e Toiletries*. v. 13. n. 14. P. 54-64. 2001.
- FARMACOPEIA PORTUGUESA VIII. Lisboa: Ministério da Saúde, Infarmed; 2005.
- FAURÉ, M.; Lissi, E.; Torres, R.; Videla, L. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. *Phytochemistry* 29: 3773-3775, 1990.
- FERREIRA, A. Guia Prático da Farmácia Magistral. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008, v.1.
- FRÉZARD, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím. Nova* vol.28 no.3 São Paulo Maio/Junho 2005.
- GONÇALVES, M.C.F. *Desenvolvimento, Caracterização Físico-Química e Avaliação Biológica de Quitossomas para a Liberação Cutânea de Melatonina*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 2008.
- HO, C-T.; Ferraro, T; Chen, Q.; Rosen, R.T. e Huang, M-T. Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer- Preventive Properties.in: *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. C-T. Ho; T. Osawa, M-T. 1994.
- JAFARI, S.M., He, Y., Bhandari, B.. Encapsulation of nanoparticles of dlimonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying techniques. *Drying Technology*, v.25, p. 1079-1089, 2007.
- JENNING, V.; Schäfer-Korting, M.; Gohla, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, v.66, p.115-126, 2000.
- JONES, M. The History of Lecithin Pluronic Organogel. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. May 7(3): 180-2. 2003.
- LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.
- MARON, L.B.; Covas, C.P.; Silveira, N.P.; Pohlmann, A.; Mertins, O.; Tatsuo, L.N.; Sant'anna, O.A.B.; Moro, A.M.; Takata, C.S.; Araujo, P.S.; Costa, M.H.B. *Journal of Liposome Research*. 17, 155, 2007.
- MARSTON A., Kissling, J., Hostettmann, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* v.13, p. 51-54, 1995.
- MERTINS, O. Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana. Tese de doutorado. Porto Alegre: UFRGS, 2008.
- MEYER, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Journal of Nutrition*, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- MIDDLETON E, Drzewiecki G. Ascorbic acid protects against flavonoid oxidation: A possible mechanism of augmented flavonoid effects (Abstract). *J Allergy Clin Immunol*. 2000.
- NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. *Cosmetics & Toiletries*, v. 20, jan-fev, p. 22, 2008.
- NIERO, R.; Malheiros, A. Principais Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos. In Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. *Química de produtos naturais, novos fármacos e moderna farmacognosia*, Editora Univali, 2007.
- OLIVEIRA, A. Z. M. *Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico* - Dissertação de mestrado-Universidade de porto. Portugal. 2009.

- Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4631/1/Lapa_FR_2006_dissertacao_Mestrado.pdf. Acesso em: 16 fev. 2009.
- PECORA, R. *Dynamic Light Scattering*. ISBN 0306417901, Springer, 436p, 1985.
- PEREIRA, N., Carneiro, S., Silvestre, M., Teles, N., Figueredo da Silva, J., Machado, C.M., Pereira, E.C., da Silva, N.H., Honda, N.K., Santos Magalhães, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 154–160, 2006.
- PERES, L.E.P. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba-SP:ESALQ/USP, 2004.
- PERRY, E. K.; Pickering, A. T.; Wang, W. W.; Houghton, P. J.; Perry, N. S. L. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 527, 1999.
- PINTO, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002
- RIBEIRO, J. F.; ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. *Aproveitamento Alimentar de Espécies Nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá*. Planaltina: EMBRAPA CPAC, 1987.
- RIDOUT, G., SANTUS, G. AND GUY, R. H. Pharmacokinetic considerations in the use of newer transdermal formulations. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, 15, 114-131, 1988.
- SHIM, J.; Kang, H. S.; Park, W-S.; Han, S-H.; Kim, J.; Chang, I-S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 97, p. 477-484, 2004.
- SILVA, Maria de Lourdes e . *Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática – Tese de doutorado-Universidade Federal da Bahia. Brasil - 2012. Disponível em: <http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/bitstream/ri/11655/1/Tese%20Maria%20de%20Lourdes%20Completa.pdf>. Acesso em 29 jul. 2014.*
- SINGER, S. J. and Nicholson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, Washington, 720–731, 1972.
- SOUSA, C. M. M.; Silva, H. R.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Brasil Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.
- VERMA, D. D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 258, p. 141-151, 2003.
- WILLIMANN, H, Walde, P, Luisi, P. L., Gazzaniga, A., Stroppolo, F. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Sep; 81(9):871-4. 1992.
- ZETASIZER NANO SERIES. *User Manual*. England: Malvern Instruments, 2004.