



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



AUDREY ALESANDRA STINGHEN GARCIA LONNI

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO DE
USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE *TRICHILIA*
***CATIGUA* PARA FINS COSMÉTICO**

MARINGÁ
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



Área de Concentração: Produtos naturais Biologicamente Ativos

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO DE
USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE *TRICHILIA*
***CATIGUA* PARA FINS COSMÉTICO**

Tese apresentada por Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

MARINGÁ
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L861d Lonni, Audrey Alesandra Stinghen Garcia.
Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* para fins cosmético / Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni. – Maringá, 2012.
118 f.: il.

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello.
Co-orientador: Ieda Spacino Scarminio.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia.

1. *Trichilia catigua* – Teses . 2. Catuaba – Teses. 3. Cosméticos – Fórmulas e receitas – Teses. 4. Quimiometria – Teses. 5. Emulsão múltipla – Teses. 6. Nanoemulsão – Teses. 7. Espectroscopia fotoacústica – Teses. 8. Pele – Envelhecimento. I. Mello, João Carlos Palazzo de. II. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDU 687.55:616.5

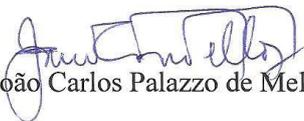
AUDREY ALESANDRA STINGHEN GARCIA LONNI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO DE
USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE
TRICHILIA CATIGUA PARA FINS COSMÉTICO**

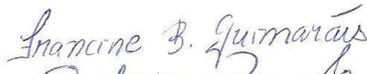
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de março de 2012

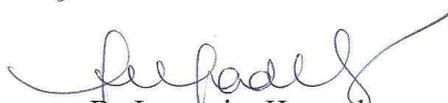
BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Dr. Francine Guimarães Astrath



Dr. Gislaine Ricci Leonardi


Dr. Luzmarina Hernandes


Dr. Roy Edward Bruns

*Aos meus grandes amores: Italo Junior, Italo Neto e Eduardo
pelo amor incondicional, apoio e paciência, tornando possível
a minha caminhada até aqui.*

A Nossa Senhora

“Cubra-me com seu manto de amor
Guarda-me na paz desse olhar
Cura-me as feridas e a dor me faz suportar
Que as pedras do meu caminho
Meus pés suportem pisar
Mesmo ferido de espinhos me ajude a passar
Se ficaram mágoas em mim
Mãe tira do meu coração
E aqueles que eu fiz sofrer peço perdão
Se eu curvar meu corpo na dor
Me alivia o peso da cruz
Interceda por mim minha mãe junto a Jesus...
Sempre que o meu pranto rolar
Ponha sobre mim suas mãos
Aumenta minha fé e acalma o meu coração
Grande é a procissão a pedir
A misericórdia e o perdão
A cura do corpo e pra alma a salvação
Pobres pecadores oh mãe
Tão necessitados de vós
Santa Mãe de Deus tem piedade de nós
De joelhos aos vossos pés
Estendei a nós vossas mãos
Rogai por todos nós vossos filhos meus irmãos
Nossa Senhora me dê a mão
Cuida do meu coração
Da minha vida do Meu Destino
Do meu caminho
Cuida de mim”

(Roberto Carlos)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por ter me suprido com toda sabedoria e força em todos os momentos desta trajetória.
- Aos meus pais, Waldomiro e Isólde, que me apoiaram incondicionalmente com estímulo, dedicação, paciência, carinho, compreensão e principalmente amor. As minhas irmãs, Luciana e Marília, e todo o restante de minha família por acreditarem e torcerem pelo meu sucesso.
- Aos meus sogros, Italo e Ligia, por toda a dedicação e amor e que me impulsionaram a seguir em frente, sempre.
- Em especial ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello, professor e amigo de todas as horas, pela excelente orientação, dedicação e concretização deste trabalho, e principalmente pelo incentivo e amizade.
- A professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, que além da ciência, me ensinou o valor da amizade e da humildade diante de extraordinárias conquistas profissionais.
- Ao professor Dr. Marcos Luciano Bruschi pela valiosa colaboração, dedicação, amizade e maravilhosa contribuição no trabalho.
- Às professoras Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello e Dra. Maria Raquel Marçal Natali pelas contribuições, orientações e grande auxílio neste trabalho.
- Aos professores Dr. Mauro Baesso, Dra Maria da Conceição Torrado Truiti, Dra. Marli Miriam de Souza Lima, Dra. Selma Lucy Franco, Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, Dra. Regina Regina Correia Gonçalves, Dr. Celso Vataru Nakamura pelo apoio durante todo este trabalho.
- A minha irmã de coração, Andréa Diniz, que me ensinou que família vai muito além de laços de sangue.
- Às minhas amigas Gisely Cristiny Lopes, Renata Longhini e Francisca Helena Mesquita de Carvalho pela intensa colaboração, amizade e incentivo em todas as horas.
- Em especial a amiga Francine Guimarães Astrath pela imensa colaboração neste trabalho, o meu muito obrigado.
- A todos meus amigos de laboratório Vanessa, Mayara, Maria Cristina, Isabela, Lizziane, Débora, Renato, Maisa, Fernanda, Traudi, Monica, Raphaela, Lucas, Yeda, Maira, Aldair, Talita, Sabrina, Elisa, Fernanda e Danilo por dividir conhecimento e amizade, lágrimas e risos.
- Aos meus amigos e funcionários da Universidade Estadual de Maringá Cláudio, Admir, Nilson, Maria Euride e Rose pela amizade e apoio ilimitado.

- A querida amiga Maria Aparecida Letrari pela gentileza de colocar este trabalho nas normas legais.
- Ao Laboratório Catarinense S.A. pela cedência de algumas amostras de cascas de catuaba, na pessoa da farmacêutica Angelita Boldieri de Souza.
- A coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo profissionalismo e dedicação.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.
- À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni



Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual de Londrina - UEL (1991), Aperfeiçoamento em Cosmetologia Aplicada pelo Instituto Racine (1996), mestrado em Química dos Recursos Naturais pela UEL (2002), especialização em Farmacotécnica Homeopática pelo Curso de Especialização em Homeopatia de Londrina (2004). Foi docente colaboradora das disciplinas de Cosmetologia, Farmacotécnica Homeopática e Farmacognosia do Curso de Farmácia da UEL (2002-2010). Atuou como Diretora do Laboratório de Produção de Medicamentos da UEL (2004-2006). Foi coordenadora de Curso de Especialização na Unifil, Centro Universitário Filadélfia (2002-2006), e no Instituto de Ensino Somay (2003-2010). Foi diretora executiva da Indústria de Cosméticos Vitturia (1994-1998). Iniciou, em 2012, as atividades como docente efetiva da disciplina de Cosmetologia e Homeopatia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Autora de quatro capítulos no livro "Homeopatia: princípios e aplicações na agroecologia". Membro associado da Associação Brasileira de Cosmetologia e Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em tecnologia de fitocosméticos e medicamentos homeopáticos. Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá (2008-2012).

RESUMO

LONNI, A. A. S. G. **Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* para fins cosmético.** 2012. 118f. Tese (Doutorado). Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

Nos últimos anos várias áreas da Ciência vêm se unindo a fim de compreender, elucidar, retardar e reverter o processo de envelhecimento da pele humana. Estima-se que cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios ultravioletas e pelos radicais livres. A aplicação tópica de antioxidantes tem por objetivo reduzir esses danos oxidativos e assim promover ação antienvhecimento. Estudos mostraram que o extrato bruto e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae), popularmente conhecida como Catuaba, apresentaram capacidade antioxidante superior a das vitaminas C e E. Com o auxílio da quimiometria, especificamente, modelo estatístico de misturas, análise de componentes principais, análise de agrupamentos hierárquica e superfície de resposta foi possível otimizar o processo de obtenção de um extrato de cascas *T. catigua* (ETC) com maior rendimento, alto teor de polifenóis totais e atividade antioxidante. Os espectros no UV dos picos cromatográficos do extrato obtido da mistura quaternária (água-metanol-acetona-etanol; 1:1:1:1) indicaram a presença de cinchonaínas, derivados de ácido gálico, polifenóis, flavonoides, catequinas e epicatequinas. Para preservar a atividade do ETC na formulação e na pele, foi desenvolvida e caracterizada uma emulsão múltipla do tipo A/O/A em duas concentrações: 0,5% (p/p) e 1,0% (p/p). Nove formulações foram desenvolvidas com e sem extrato, baseadas nos óleos vegetais andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) e canola (*Brassica napus* L.), tensoativos não-iônicos de baixo e alto EHL, propilenoglicol e água destilada. Nanoemulsão foi obtida nas nove formulações, resultado do processo de emulsificação por inversão de fases. As emulsões múltiplas foram caracterizadas quanto aos aspectos macro e microscópico, distribuição granulométrica, valores de pH, condutividade e reologia. Os testes de caracterização permitiram a seleção das formulações obtidas com o óleo de canola, sem e com ETC, nas duas concentrações. As formulações avaliadas apresentaram perfil reológico Não-Newtoniano pseudoplástico com pequena área de histerese tixotrópica. A determinação do perfil de liberação *in vitro* do ETC a partir dos sistemas demonstrou que o extrato contido na emulsão (1,0%) pode ser liberado de forma controlada por um período de 16 h na pele, enquanto que o ETC contido na emulsão (0,5%) pode ser liberado de forma controlada por um período de 23 h. A permeação cutânea foi determinada pela utilização da Espectroscopia Fotoacústica *ex vivo*. Foi identificada a presença de ETC na epiderme e derme, sendo mais evidente com a formulação contendo 1,0% ETC. Adicionalmente, as análises histológicas e histopatológicas foram investigadas em orelhas de coelhos. Os resultados mostraram que as formulações estudadas são seguras nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, podendo seu uso ser favorável. Por fim, as formulações contendo óleo de canola, sem e com ETC (0,5 e 1,0%), foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada por 90 dias. A formulação sem ETC se mostrou instável, com floculação, em baixas temperaturas (-20 °C). A formulação contendo 1,0% (p/p) apresentou instabilidade, com separação de fases e diminuição do teor de polifenóis, à temperatura elevada (40 °C) após 90 dias. Os outros parâmetros de avaliação e análise empregadas mantiveram-se estáveis. Os resultados sugerem que as formulações estudadas são adequadas para o uso cosmético, entretanto, não podem ficar expostas à temperatura elevada.

Palavras-chave: *Trichilia catigua*; catuaba, quimiometria, emulsão múltipla, nanoemulsão, espectroscopia fotoacústica.

ABSTRACT

LONNI, A.A.S.G. **Development and Characterization of topical formulation containing *Trichilia catigua* standardized extract for cosmetic care.** 2012. 118s. Thesis (Doctorate). Pharmacy Department, Healthy Science Centre, Maringá State University, Maringá, 2012.

In the last few years, several areas in Science have been together in order to understand, clarify, detain and revert the aging skin process. It is believed that about 80% of visible signs caused during the aging process are due to ultraviolet radiation and free radicals. The aim of topical administration of antioxidants is to reduce these oxidative damages, therefore promoting the anti-aging action. Studies have been showing that crude extract and isolated substances of *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae), popularly known as "Catuaba", showed antioxidant capacity greater than vitamins C and E. With the help of chemometrics, specifically, statistical mixtures design, principal component and hierarchical clustering analysis, and response surfaces provided the highest yields, total polyphenol contents and antioxidant activities of the crude extracts of *T. catigua* (TCE). The spectra of the chromatographic peaks of quaternary mixtures (water-methanol-acetone-ethanol; 1:1:1:1) indicated the presence of cinchonins, gallic acid derivatives, polyphenols, flavanoids, catechins, and epicatechins. In order to preserve the extract activity in the formulation and in the skin, a W/O/W type multiple emulsion containing TCE in two concentrations: 0.5% (w/w) e 1.0% (w/w) was developed and characterized. Nine formulations were developed with and without extract containing vegetal oils: "andiroba" (*Carapa guianensis* Aubl.), "buriti" (*Mauritia flexuosa* L.) and "canola" oil (*Brassica napus* L.), non-ionic surfactants of low and high HLB, propylene glycol and distilled water. Nanoemulsions were obtained by the phase inversion emulsification method. Formulations were characterized as macroscopic and microscopic aspects, granulometric analysis, pH values, conductivity, and rheology. The characterization tests permitted the selection of the formulations obtained from "canola" oil with and without TCE, in both concentrations. The formulations tested showed Non-Newtonian rheological profile and pseudoplastic behavior with minimal thixotropy. The *in vitro* release profile of these systems showed that the TCE of emulsion (1.0%) can be released in a controlled manner for a period of 16 h, while the TCE (0.5%) can be released in a controlled manner for a period of 23 h. The percutaneous penetration was evaluated by *ex vivo* photoacoustic spectroscopy. Was identified the presence of TCE in the epidermis and dermis, more evident with the formulation containing 1.0% TCE. In addition, the histological and histopathological analyzes were investigated in rabbits' ears. The results showed that the formulations are safe under normal or reasonably foreseeable use, its use may be favorable. Finally, the formulation containing canola oil, with and without the TCE (0.5 and 1.0%) were submitted to accelerated stability testing for 90 days. The formulation without ETC proved unstable, with flocculation at low temperatures (-20 °C). The formulation containing 1.0% TCE showed instability with reduced phase separation and the polyphenol content at elevated temperature (40 °C) after 90 days. The other parameters of evaluation and analysis employed remained stable. The results suggest that the formulations studied are suitable for cosmetic use, however, can't be exposed to elevated temperature.

Key-words: *T. catigua*; "catuaba", chemometrics, multiple emulsion, nanoemulsion, photoacoustic spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Aspecto geral das cascas da espécie <i>Trichilia catigua</i> e detalhe da casca cominuída.....	23
Figura 2.2 - Conceitos fundamentais relativos à análise de dados e suas relações	26
Figura 2.3 - Esquema da sequência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica)	27
Figura 2.4 - Eixos das variáveis com três componentes principais	30
Figura 2.5 - Representação gráfica da análise de componentes principais	31
Figura 2.6 - Tipos de ligações para formar um dendrograma, conexão simples, completa e centróide	33
Figura 2.7 - Planejamento centróide simplex para o estudo de misturas de quatro componentes	35
Figura 2.8 - Fotografia de Célula de Difusão de Franz modificada	38
Figura 2.9 - Esquema demonstrando a configuração experimental da espectroscopia fotoacústica.....	41

CAPÍTULO 3 - ARTIGO A

Figure 3.1. Response surface contour plot of the special cubic model predicted yield as a function of the acetone, water and methanol proportions for 25% ethanol	52
Figure 3.2. Hierarchical analysis dendrogram of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks of the 1:1:1:1 water, methanol, acetone, and ethanol extraction mixture	54
Figure 3.3. Score plot of PC1 against PC2 of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks of the 1:1:1:1 water, methanol, acetone, and ethanol extraction mixture	55

CAPÍTULO 4 - ARTIGO B

Figure 4.1 - Schematic representation of W/O/W multiple emulsion with TCE. Chemical structure of the PEG 40 hydrogenated castor oil, sorbitan monooleate, and canola oil	69
Figure 4.2 - Photomicrographs of W/O/W multiple emulsion, with and without TCE. Droplets size showed: a) MEATC05 b) MEBTC05 c) MECTC05 and with 1.0% (w/w) TC: d) MEATC1, e) MEBTC1 and f) MECTC1. Original magnification 1000X.....	70
Figure 4.3 – Size distribution of canola oil droplets with 0.5% (w/w) <i>T. catigua</i> extract (a) and 1.0% (w/w) <i>T. catigua</i> extract (b): size frequency distribution (bars) and size cumulative frequency distribution (line). The particle size class interval is 100 nm	72
Figure 4.4 - Flow rheograms of canola's formulations (a) without extract (b) with 0.5% TCE (w/w) and with 1.0% TCE (w/w) at 25°C. Red colors show the upcurve and blue colors the downcurve. Standard deviations have	

	been omitted for clarity; however, in all cases the coefficient of variation of at least 3 replicate tests was less than 5%	73
Figure 4.5-	Flow rheograms of formulation without (a) and with TCE: MECTC05 (b) and MECTC1 (c). Red colors represents upcurve and blue colors represents downcurve. Standard deviations have been omitted for clarity; however, in all cases, the coefficient of variation of replicate analyses was less than 7%	74
Figure 4.6 –	Release profile of canola oil multiple emulsion with <i>T. catigua</i> extract (TCE): ■ marker multiple emulsion with TCE 0.5% (w/w); ♦ marker multiple emulsion with TCE 1.0% (w/w).....	75

CAPÍTULO 5 - ARTIGO C

Figura 5.1 –	Esquema demonstrando a configuração experimental da espectroscopia fotoacústica (a). Detalhes da amostra de pele na célula fotoacústica (b)	91
Figura 5.2 –	Imagens macroscópicas (esquerda) e histológicas (direita) de orelhas de coelhos. Grupo controle - G1 (a, b); Controle da emulsão base - G2 (c,d); e, f) Tratado com a emulsão com 1,0% (p/p) ETC - G3 (e,f); Tratado com a emulsão com 0,5% (p/p) ETC – G4 (g, h). Coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina.....	94
Figura 5.3 –	Espectros de absorção óptica do extrato de <i>T. catigua</i> (—) e da pele da orelhas dos coelhos após a aplicação de emulsão base (—), com 1,0% (p/p) de ETC (—) e com 0,5% (p/p) de ETC (—).....	96
Figura 5.4 –	Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz na superfície epidérmica das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de <i>T. catigua</i> (—) e o espectro da emulsão com extrato de <i>T. catigua</i> 1,0% (—).....	97
Figura 5.5 –	Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces inferiores (derme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 1,0% de extrato de <i>T. catigua</i> (—) e o espectro da emulsão com extrato de <i>T. catigua</i> 1,0% (—).....	98
Figura 5.6 –	Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces superiores (epiderme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de <i>T. catigua</i> (—) e o espectro da emulsão com extrato de <i>T. catigua</i> 0,5% (—).....	99
Figura 5.7 –	Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces inferiores (derme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de <i>T. catigua</i> (—) e o espectro da emulsão com extrato de <i>T. catigua</i> 0,5% (—).....	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Métodos de pré-processamento mais comuns para a análise multivariada de dados.....	28
--	----

CAPÍTULO 3 - ARTIGO A

Table 3.1 - Proportions of solvents for mixtures in the extraction procedure and determination of mass yield, total polyphenol content and antioxidant capacity (IC ₅₀) in the crude extracts of <i>Trichilia catigua</i> barks.....	49
---	----

CAPÍTULO 4 - ARTIGO B

Table 4.1 - Composition of nine formulations different multiple emulsions (W/O/W) respectively of the andiroba, buriti, and canola oil: without TCE (MEA, MEB and MEC), with 0.5 % TCE (MEATC05, MEBTC05 and MECTC05), and with 1.0% TCE (MEATC1, MEBTC1 and MECTC1), and the required HLB number of each formulation	64
Table 4.2 - Power Law Parameters of Formulations with and without <i>T. catigua</i> extract (TCE) at 25 °C	73
Table 4.3 - Time (hours) required for the release to 10, 30, 50, and 100% of the original mass of TCE from the formulations under examination	75
Table 4.4 - Results for pH, conductivity (c) and droplet size (size) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C, 40 ± 2 °C with 75% ± 5% UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil and without TCE	76
Table 4.5 - Results of pH, conductivity (c), droplet size (size) and polyphenol content (TPC) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C and 40 ± 2 °C with 75% ± 5% UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil added 0.5% TC (MECTC05).....	77
Table 4.6 - Results of pH, conductivity (c), droplet size (size) and polyphenol content (TPC) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C and 40 ± 2 °C 75% ± 5% UR with 75% ± 5% UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil added 1.0% TC (MECTC1)...	78

CAPÍTULO 5 - ARTIGO C

Tabela 5.1 - Avaliação de acantose e potencial comedogênico de orelhas de coelhos em todos os grupos (n = 6/grupo), onde G1: controle; G2: controle da emulsão base; G3: emulsão com 1,0% (p/p) ETC e G4: emulsão com 0,5% (p/p) ETC.....	93
Tabela 5.2 - Avaliação hematológica e bioquímica das orelhas controle (G1); controle emulsão base (G2); emulsão com 1,0% (p/p) de ETC (G3) e emulsão com 0,5% (p/p) de ETC (G4)	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Análise hierárquica
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
C	Condutividade
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variância
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	Emulsão múltipla
EMA	Emulsão múltipla contendo óleo de andiroba
EMATC05	Emulsão múltipla de óleo de andiroba contendo 0,5 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
EMATC1	Emulsão múltipla de óleo de andiroba contendo 1,0 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
BEM	Emulsão múltipla contendo óleo de buriti
EMBTC05	Emulsão múltipla de óleo de buriti contendo 0,5 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
EMBTC1	Emulsão múltipla de óleo de buriti contendo 1,0 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
EMC	Emulsão múltipla contendo óleo de canola
EMCTC05	Emulsão múltipla de óleo de canola contendo 0,5 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
EMCTC1	Emulsão múltipla de óleo de canola contendo 1,0 % (p/p) de extrato de <i>Trichilia catigua</i>
ETC	Extrato de cascas de <i>Trichilia catigua</i>
EUA	Estados Unidos da América
FEI	Fazenda Experimental de Iguatemi
ME	Multiple emulsion
MEA	Multiple emulsion of andiroba oil
MEATC05	Multiple emulsion of andiroba oil with 0.5 % (w/w) <i>Trichilia catigua</i> extract
MEATC1	Multiple emulsion of andiroba oil with 1.0 % (w/w) <i>Trichilia catigua</i> extract
MEB	Multiple emulsion of buriti oil
MEBTC05	Multiple emulsion of buriti oil with 0.5 % (w/w) <i>Trichilia</i>

	<i>catigua</i> extract
MEBTC1	Multiple emulsion of buriti oil with 1.0 % (w/w) <i>Trichilia catigua</i> extract
MEC	Multiple emulsion of canola oil
MECTC05	Multiple emulsion of canola oil with 0.5 % (w/w) <i>Trichilia catigua</i> extract
MECTC1	Multiple emulsion of canola oil with 1.0 % (w/w) <i>Trichilia catigua</i> extract
PAS	Espectroscopia fotoacústica
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PT	Polifenóis totais
TCE	<i>Trichilia catigua</i> extract
TPC	Total polyphenol content
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Matriz
T	Matriz dos escores
P	Matriz dos loadings
P^t	Matriz transposta de P
d	Distância euclidiana
s	Similaridade entre as amostras
μ_s	Comprimento de difusão térmica
D	Difusividade térmica
f	Frequência de modulação da luz
σ	Tensão de cisalhamento (<i>shear stress</i>)
k	Índice de consistência (<i>consistency index</i>)
γ	Gradiente de cisalhamento (<i>shear rate</i>)
n	Índice de fluxo (<i>flow behaviour index</i>)
Pa	Pascal
K	Constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação
t	Tempo de liberação
M_t	Quantidade liberada
M_∞	Quantidade total
n	Expoente indicador do mecanismo de liberação
l_β	Comprimento de absorção óptica
τ	Tempo de relaxação não radiativa
p	Significância do teste estatístico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	17
1.1 INTRODUÇÃO	18
1.2 OBJETIVOS	20
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 <i>TRICHILIA CATIGUA</i> A. JUSS	23
2.1.1 Generalidades e Descrição Botânica	23
2.1.2 Avaliação da Composição Química e Atividade Biológica	24
2.2 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E DE ANÁLISE MULTIVARIADA	26
2.2.1 Processo da Análise de Dados	26
2.2.2 Pré-Processamento	28
2.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA).....	29
2.2.4 Análise de Agrupamentos (AH)	31
2.2.5 Modelagem de Misturas	33
2.3 Extração Empregando Planejamento Estatístico de Mistura.....	35
2.4 TECNOLOGIA COSMÉTICA.....	36
2.4.1 Perfil de Liberação <i>in vitro</i>	37
2.5 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	38
2.6 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS	41
2.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	42
CAPÍTULO 3 – ARTIGO A - STATISTICAL MIXTURE DESIGN SELECTIVE EXTRACTION OF COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL POLYPHENOL CONTENT FROM <i>TRICHILIA CATIGUA</i>.....	44
Resumo e Abstract	46
3.1 Introduction	47
3.2 Experimental.....	48
3.2.1 <i>General experimental procedures</i>	48
3.2.2 <i>Plant material</i>	48
3.2.3 <i>Extract preparation</i>	48
3.2.4 <i>Radical-scavenging activity (RSA) assay</i>	49
3.2.5 <i>Determination of total phenolic and total tannin contents</i>	50
3.2.6 <i>HPLC analysis</i>	50
3.2.7 <i>Computer programs</i>	50
3.3 Results and discussion	50
3.4 Concluding remarks	56
References.....	56
CAPÍTULO 4 – ARTIGO B - MULTIPLE EMULSION AS PLAT FORM TO DELIVERY <i>TRICHILIA CATIGUA</i> (CATUABA) EXTRACT: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION	58
Resumo e Abstract.....	60
4.1Introduction	61
4.2 Materials and methods.....	62
4.2.1 <i>Materials</i>	62
4.2.2 <i>Preparation and characterization of the standardized <i>T. catigua</i> extract (TCE)</i>	62
4.2.3 <i>Multiple emulsion preparation</i>	63

4.2.4 Characterization of the multiple emulsions.....	64
4.2.4.1 Morphological aspect.....	64
4.2.4.2 pH and conductance measurements	64
4.2.4.3 Droplet size analysis and distribution.....	64
4.2.5 Assay for TCE trapping efficiency.....	65
4.2.6 Continuous flow rheometry	65
4.2.7 In Vitro Release of TCE from Multiple Emulsion	66
4.2.8 Stability Study of ME containing TCE.....	66
4.2.9 Statistical Analysis.....	67
4.3 Results and Discussion	67
4.3.1 Characterisation of the TCE	67
4.3.2 Multiple emulsion preparation	67
4.3.3 Characterization of the multiple emulsions.....	70
4.3.4 Assay for TCE trapping efficiency.....	72
4.3.5 Continuous shear (flow) rheometry.....	72
4.3.6 In Vitro Release of TCE from Multiple Emulsion	74
4.3.7 Stability Study of TCE from Canola Multiple Emulsion	75
4.4. Conclusions	78
References.....	79

CAPÍTULO 5 – ARTIGO C - ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO CUTÂNEA POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA E DA SEGURANÇA DE FORMULAÇÃO COSMÉTICA CONTENDO EXTRATO DE *TRICHILIA CATIGUA* (CATUABA)..... 83

Resumo e Abstract.....	85
5.1 Introdução	86
5.2. Materiais e Métodos	87
5.2.1 Preparo da Formulação	87
5.2.2 Animais.....	87
5.2.3 Protocolo do estudo	88
5.2.4 Avaliação macroscópica	88
5.2.5 Avaliação toxicológica	88
5.2.6 Avaliação histológica	89
5.2.7 Penetração percutânea avaliada	90
5.2.8 Medidas de espectroscopia fotoacústica.....	90
5.2.9 Análise estatística	92
5.3 Resultados e Discussão	92
5.3.1 Análise macroscópica e histológica.....	92
5.3.2 Avaliação Toxicológica.....	95
5.3.3 Análise da Permeação Cutânea por Fotoacústica	95
5.4 Conclusão	100
Referências	101

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES 104

REFERÊNCIAS 106

PERSPECTIVAS..... 115

ANEXOS 117

ANEXO A – Parecer Comitê de Ética 118



CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

Os fitocosméticos vêm ganhando aceitação por parte dos profissionais da área cosmética e dos consumidores. A incorporação de extratos vegetais ou ativos naturais isolados em produtos cosméticos tem sido cada vez mais motivada por pesquisadores e formuladores da área, considerando o aumento da expectativa do tempo de vida e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento (IBGE, 2008). Porém, é preciso cautela e um estudo minucioso na eficácia e segurança de cosméticos contendo extratos vegetais para a obtenção de produtos de alta qualidade aliado ao comprometimento com o desenvolvimento sustentável, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira (FRANQUILINO, 2006).

Várias hipóteses e constantes estudos são realizados com o intuito de elucidar o envelhecimento cutâneo, e de acordo com Magalhães (2000) um dos principais responsáveis pelo processo de envelhecimento é o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante de nosso organismo. Para prevenir e contornar este processo torna-se necessário reforçar nossas defesas naturais antioxidantes endógenas. Nesse sentido diversas substâncias antioxidantes exógenas, como extratos vegetais, vitaminas, dentre outras, são utilizadas pela Cosmetologia nos produtos antienvhecimento (SCOTTI et al., 2007).

Estima-se que cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios ultravioletas e pelos radicais livres (BUCHLI, 2002). A aplicação tópica de antioxidantes tem por objetivo reduzir os danos oxidativos induzidos pela radiação ultravioleta, prevenir ou atenuar a formação de neoplasma cutâneo induzido pela radiação ultravioleta e assim promover também ação antienvhecimento (GUARATINI et al., 2007; SCOTTI et al., 2007).

Estudos mostram que os taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (RICE-EVANS, 1997; YOKOZAWA et al., 1998; MELLO; SANTOS, 2003). Desta forma, passam a ter importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos, como o envelhecimento cutâneo.

Trichilia catigua A. Juss (Meliaceae), popularmente conhecida como catuaba, tem sido utilizada para o tratamento de insônia e depressão (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011) e estimulante do sistema nervoso (CAMPOS et al., 2005). Possui também efeito adaptógeno (MENDES; CARLINI, 2007), antimicrobiano (PIZZOLATTI et al., 2002a),

efeito antiarrítmico (PONTIERI et al., 2007), atividade antiinflamatória (QUINTÃO et al., 2008), tripanocida (PIZZOLATTI et al., 2003), entre outras atividades.

No entanto, algumas das atividades biológicas de *T. catigua* podem derivar da capacidade em exercer ações de proteção e/ou inibição dos radicais livres. Por conseguinte, a atividade antioxidante foi descrita para diferentes extratos e substâncias isoladas das cascas desta planta pelo teste de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (DE BRUYNE et al., 1999; ALBRECHT et al., 2007; TANG et al., 2007; BRIGHENTE et al. 2007; RESENDE, 2011).

A extração das substâncias ativas da planta é uma etapa fundamental, pois uma escolha pouco criteriosa dos solventes pode significar um gasto enorme de tempo e reagentes para se chegar a resultados de pouco valor e interesse, sendo assim, a escolha da melhor condição experimental deve ser feita através de um planejamento, pois, o meio extrativo depende, sobretudo, da solubilidade e interação das substâncias a extrair e de sua estabilidade (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). Nos últimos anos, modelos estatísticos têm sido aplicados com êxito para minimizar o número de experimentos, bem como identificar os efeitos de interação entre as variáveis experimentais, como a força do solvente e as interações que ocorrem entre a planta e os solventes, com resultados satisfatórios para otimizar os procedimentos de extração (BOX et al., 2005; BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2006).

Quando se desenvolve uma formulação para uso tópico, vários aspectos devem ser considerados com a finalidade de garantir sua qualidade, segurança e eficiência (CHORILLI et al., 2003; RIBEIRO, 2006; LEONARDI, 2008). Emulsões múltiplas são sistemas complexos compostos por duas emulsificações, onde os dois tipos de emulsões (A/O e O/A ou O/A e A/O) existem simultaneamente, constituindo emulsões do tipo A/O/A ou O/A/O (ASERIN, 2008). Devido à sua estrutura, esses sistemas múltiplos apresentam aplicações de microencapsulação nas áreas cosmética, farmacêutica (MA et al., 2006; MORAIS et al., 2006; HEMAR et al., 2010), e alimentícia (BONNET et al., 2009). Estes sistemas têm apresentado grande interesse por ter capacidade de dissolver ou dispersar ativos nas diversas fases, veicular componentes incompatíveis e instáveis, além de possibilitar a liberação com perfil modificado de substâncias ativas (TADROS, 2000; OZER, et al., 2007).

De acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2003) a avaliação de segurança de um produto cosmético pressupõe uma abordagem caso a caso. Preliminarmente, observam-se todas as informações disponíveis que contribuam para o conhecimento do risco potencial, em condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso e, os animais podem ser utilizados para avaliar todos os riscos potenciais envolvidos, seja

irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo (BRASIL, 2003). Dessa forma, o potencial comedogênico e a toxicidade de formulações acrescidas de extratos vegetais podem ser avaliados por análise histológica, em coelhos, na busca dessa segurança, que deve incorporar permanentemente o avanço do estado da arte da ciência cosmética.

Por outro lado, estudos mostram que a espectroscopia fotoacústica é uma técnica útil para a avaliação da penetração e distribuição de substâncias através da pele seja *in vitro*, *ex-vivo* e/ou *in vivo*, para a indústria cosmética e farmacêutica. Desta forma, esta técnica avalia o potencial do produto na atuação nas diversas camadas da pele (BAESSO, SNOOK, ANDREWS, 1994; BECKMANN et al., 2002; SEHN et al., 2003; NOTINGHER; IMHOF, 2004; MITCHEM; MIO; SNOOK, 2004; PEDROCHI et al., 2005; ROCHA et al., 2007; TRUITE et al., 2007).

Neste trabalho, a tecnologia cosmética associada à fitoquímica, quimiometria, histologia e permeação cutânea determinada por fotoacústica, formaram um método de pesquisa inovador, possibilitando estudos avançados no desenvolvimento de uma formulação cosmética contendo extrato bruto de *T. catigua* nanoencapsulado. Dessa forma fortalece-se o desenvolvimento de cosméticos com extratos ativos provenientes da biodiversidade brasileira.

1.2 OBJETIVOS

Preparar um extrato bruto padronizado das cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. com altos teores em polifenóis totais e capacidade antioxidante visando obter uma formulação para uso cosmético. Os objetivos específicos realizados foram:

1. Aplicar método quimiométrico de planejamento experimental e de análise multivariada na obtenção de um extrato com altos teores em polifenóis totais, rendimento e capacidade antioxidante.
2. Desenvolver, preparar e caracterizar uma formulação de uso tópico com extrato bruto de *T. catigua* por meio da tecnologia cosmética.
3. Avaliar o perfil de liberação *in vitro* das formulações cosméticas contendo extrato bruto de *T. catigua*.
4. Avaliar a permeação cutânea da formulação cosmética contendo extrato bruto de *T. catigua* utilizando a espectroscopia fotoacústica.

5. Avaliar a segurança, por meio de ensaios de comedogenicidade, histológica, hematológica e bioquímica, das formulações cosméticas contendo extrato bruto de *T. catigua*.
6. Avaliar a estabilidade química das formulações cosméticas contendo extrato bruto de *T. catigua*.

Dessa forma a tese foi organizada em cinco capítulos, a saber:

- Capítulo I: Introdução e Objetivos
- Capítulo II: Revisão da literatura
- Capítulo III: Artigo “Statistical Mixture Design Selective Extraction of Compounds with Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content from *Trichilia catigua*” publicado na revista *Analytica Chimica Acta* em janeiro de 2012.
 - Aplicar método quimiométrico de planejamento experimental e de análise multivariada na obtenção de um extrato com altos teores em polifenóis totais, rendimento e capacidade antioxidante.
- Capítulo IV: Artigo “Multiple emulsion as plat form to delivery *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: development and characterization”
 - Desenvolver, preparar e caracterizar uma formulação de uso tópico com extrato contendo ETC por meio da tecnologia cosmética. Assim como, avaliar a estabilidade química das formulações cosméticas contendo extrato bruto de *T. catigua*.
- Capítulo V: Artigo “Estudos pré-clínicos para avaliação da permeação cutânea por espectroscopia fotoacústica e da segurança de formulação cosmética contendo extrato de *Trichilia catigua* (Catuaba)”
 - Avaliar a segurança, por meio de ensaios de comedogenicidade, histológica, hematológica e bioquímica, das formulações cosméticas contendo extrato bruto de *T. catigua*.



CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *TRICHILIA CATIGUA* A. JUSS.

2.1.1 Generalidades e Descrição Botânica

Popularmente conhecida como catuaba, pertence à família Meliaceae, é encontrada em florestas semidecíduais e em parte da mata Atlântica, e conhecida como catigua, catiguá vermelho, catuama, pau ervilha e catuaba do norte (KLEIN, 1984; GARCEZ, 1997). Constitui-se numa árvore de 10 m de altura, sendo que os ramos novos pubescentes tornam-se glabros com a idade e de coloração acinzentada. A parte utilizada é a casca, conforme pode ser visto na Figura 2.1. As folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, são curto-pediceladas, oblongo-elípticas, ápice acuminado, irregularmente agudos na base, de até 7 cm de comprimento. As flores podem apresentar coloração branco-amarelada e o fruto é constituído de uma cápsula estreito-oblonga, com pêlos longos rijos e amarelados com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente, aparecendo de dezembro a janeiro. A época de floração é de setembro a outubro, entretanto, a cápsula pode permanecer na árvore por 5 a 6 meses antes de florescer (SOUZA et al., 2001; LAGOS; MIGUEL; DUARTE, 2007).

Figura 2.1 - Aspecto geral das cascas da espécie *Trichilia catigua* e detalhe da casca cominuída.



Fonte: Da autora.

As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como catuaba, são representadas por mais de 10 espécies diferentes, sendo: *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld & J.F. Souza (Bignoniaceae), *Tommandenia violaceae* (Vell.) Miers (Apocynaceae), *Tetragastria catuaba* N.S.Cunha (Burséraceae), *Secundatia floribunda* DC.

Secundatia floribunda (Apocynaceae), *Pouteria* Aubl (Sapotaceae), *Phyllanthus nobilis* (L. f.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae), *Erythroxylum catuaba* da Silva ex Hamet e *E. vacciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae) (PEREIRA, 1982; LAGOS; MIGUEL; DUARTE, 2007). Contudo, a planta encontrada mais comumente no Brasil como catuaba é a espécie vegetal *Trichilia catigua* A. Juss. (MARQUES, 1998).

2.1.2 Avaliação da Composição Química e Atividade Biológica

A análise química preliminar de extratos e substâncias isoladas de *Trichilia catigua* indicou a presença de ômega-fenil alcanos, ácidos ômega-fenil alcanóicos, ômega-fenil-gama-lactonas, alquil-gama-lactonas, alcenil-gama-lactonas e ácidos graxos, além de β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, e também as flavalignananas: cinchonainas Ia, Ib, Ic e Id (PIZZOLATTI et al., 2002a; BELTRAME, 2005; BELTRAME et al., 2006; TANG et al., 2007; RESENDE et al., 2011), Iia, Iib, Iic e apocinina E (LAGOS; MIGUEL; DUARTE, 2006; RESENDE et al., 2011), catequina, epicatequina, procianidinas B2, B4 e C1 (BELTRAME, 2005; RESENDE et al., 2011), catiguanina A e B (TANG, 2007) e ácido clorogênico (LAGOS, 2006).

É conhecida popularmente como afrodisíaca, utilizada para tratamento de impotência sexual, fadiga e déficit de memória (VAS et al., 1997). Uma função adaptógena foi também atribuída a *T. catigua*, uma vez que tem sido utilizada para diminuir as consequências de estresse e melhorar o desempenho cognitivo e físico, tanto em pacientes saudáveis quanto em doentes (MENDES; CARLINI, 2007). Preparações comercialmente disponíveis que contêm *T. catigua* exibiram ação como relaxante muscular (CALIXTO et al., 1997, ANTUNES et al., 2001), propriedades antinociceptiva (VIANA et al., 2007) e anti-inflamatória (QUINTÃO et al., 2008). Tem sido também utilizada como fitofármaco em casos de insônia, tratamento de distúrbios depressivos (CAMPOS et al., 2005; CHASSOT et al., 2011). Apresenta ainda atividade antimicrobiana e extratos hidroalcoólicos de cascas de *T. catigua* apresentam atividade citotóxica contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (PIZZOLATTI et al., 2002b, 2003).

No entanto, algumas das atividades biológicas de *T. catigua* podem derivar de sua capacidade de exercer ações de proteção e/ou inibitória contra os radicais livres (TANG et al., 2007). De Bruyne e colaboradores (1999) demonstraram as propriedades antioxidantes de taninos condensados, frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), superóxido ânion e o radical hidroxil, enquanto que extratos das cascas de *T. catigua* demonstraram esta

atividade frente ao radical DPPH (BRIGHENTE et al., 2007; ALBRECHT et al., 2007; TANG et al., 2007; RESENDE et al., 2011).

De acordo com Rice-Evans (1997), substâncias polifenólicas possuem estrutura química ideal para a atividade de sequestro de radicais livres, e tem mostrado atividade antioxidante *in vitro* mais eficiente que a vitamina C e a vitamina E, quando comparados em concentrações molares. De acordo com Pellati e colaboradores (2004), a atividade de sequestro de radicais livres de compostos fenólicos é amplamente influenciada pelo número de hidroxilas presentes nos anéis aromáticos, sendo assim, quanto maior o número de grupos hidroxila, maior é a atividade de sequestro de radicais. Este dado confere com os resultados obtidos por Resende et al. (2011), os quais demonstraram que substâncias diméricas foram mais ativas frente ao radical DPPH e na redução do ferro que os respectivos monômeros. No entanto, monômeros fenilpropanoides derivados da epicatequina possuem a mesma atividade que a procianidina B2, demonstrando que o número de centros estereogêneos podem influenciar na atividade antioxidante.

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Além da atividade antioxidante (RICE-EVANS, 1997; YOKOZAWA et al., 1998; MELLO; SANTOS, 2003), podem-se citar: antiviral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993; FELIPE et al., 2006), ação bactericida, fungicida (SANCHES et al., 2005), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993), ação antitumoral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), atividade cicatrizante (LOPES et al., 2005), entre outras.

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996; 1998).

2.2 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E DE ANÁLISE MULTIVARIADA

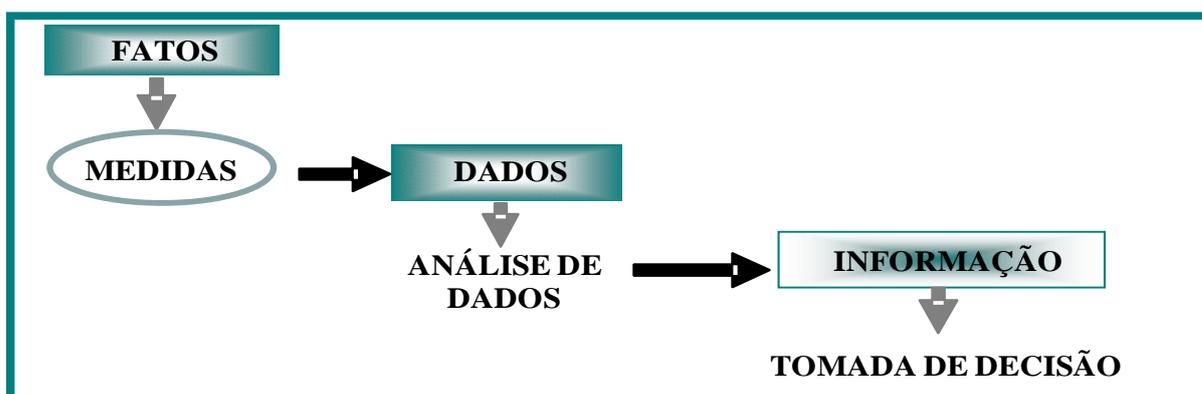
2.2.1 Processo da Análise de Dados

O processo da análise de dados pode ser explicado considerando a relação entre três conceitos: fatos, dados e informações, que são pré-requisitos para a tomada de decisões (MELLINGER, 1987). Os fatos são fenômenos e processos naturais, tais como: reações químicas, solos, plantas, entre outros. Os dados são as medidas, por exemplo: espectroscópicas, cromatográficas, físico-químicas, biológicas ou outras que foram usadas para discussões e cálculos. A informação é o conhecimento gerado a partir das investigações e estudos dos fatos e dos dados a qual é usada para a tomada de decisões. A relação entre estes três conceitos está ilustrado na Figura 2.2.

A extração de informações de resultados de um experimento químico, várias vezes envolve a análise de um considerável número de medidas, por exemplo, na aplicação de métodos espectroscópicos e cromatográficos modernos. No entanto, a informação útil ou relevante pode estar contida somente numa pequena parte destas medidas. A escolha das medidas importantes, geralmente é feita através de um critério subjetivo. Uma questão importante é, como podemos reduzir de forma objetiva o número de medidas para tornar mais fácil a interpretação e visualizar as correlações destas medidas no problema em questão?

A resposta está na aplicação de métodos matemáticos e estatísticos multivariados associados aos dados químicos, ou seja, através da aplicação de métodos quimiométricos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

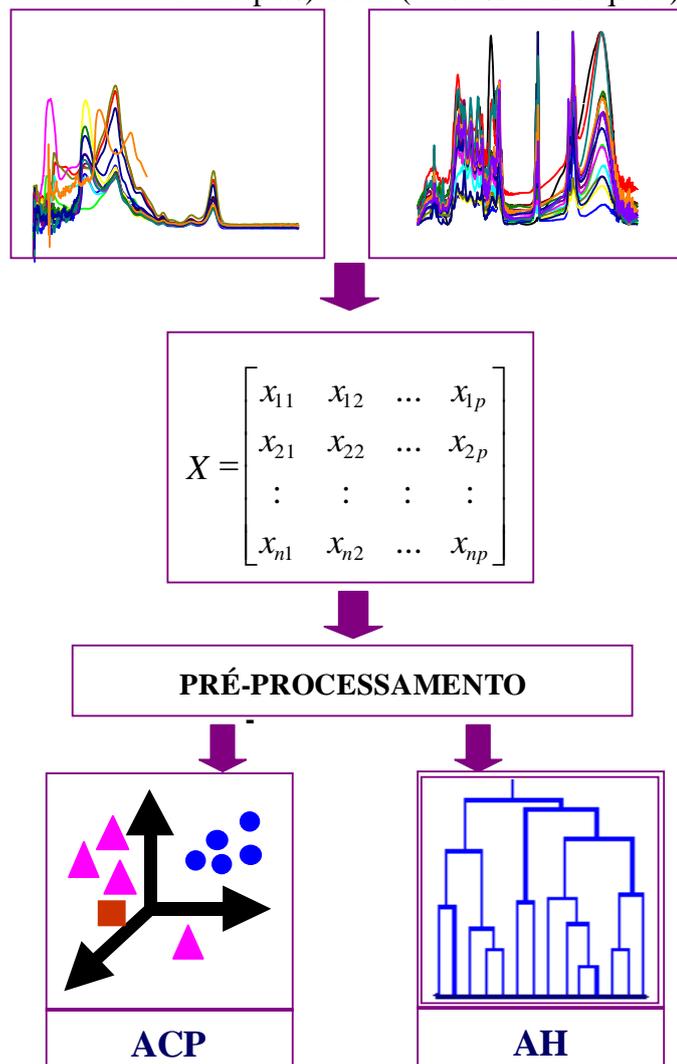
Figura 2.2 - Conceitos fundamentais relativos à análise de dados e suas relações.



A sequência básica da análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 2.3.

Antes de proceder a análise dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de bandas e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), a qual representa-se por \mathbf{X} . As N linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), enquanto que as p colunas são variáveis que correspondem a uma propriedade medida. Cada elemento da matriz contém o valor da propriedade da sua coluna na amostra da sua linha. Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que foi utilizada no cálculo (SCARMINIO, 1989).

Figura 2.3 - Esquema da sequência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).



Nas equações foram empregados as notações padrões de álgebra linear onde, as matrizes são indicadas por letras maiúsculas em negrito e os subíndices são usados para notação da linha e coluna. Os vetores são representados em letras minúsculas em negrito

2.2.2 Pré-Processamento

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo. Os métodos mais comuns para análise multivariada estão apresentados na Tabela 2.1.

Na análise exploratória os métodos mais utilizados são análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise de componentes principais (PCA).

Tabela 2.1 - Métodos de pré-processamento mais comuns para a análise multivariada de dados

AMOSTRAS (por linhas)	VARIÁVEIS (por colunas)
Normalização por área ou comprimento de vetor	Escalonamento por variância
	Centrar na média
	Autoescalonamento

Os dados foram autoescalados, onde os valores originais em cada coluna são subtraídos às respectivas médias e divididos pelo desvio padrão, Equação 1. Este procedimento transforma as variáveis originais em novas variáveis com média zero e variância igual a um,

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (1)$$

onde s_j é o desvio padrão para a variável j .

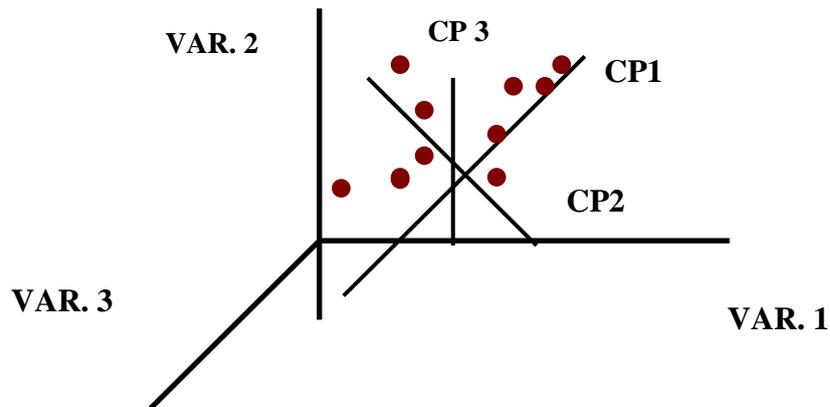
2.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

Entre todos os métodos quimiométricos, a Análise de Componentes Principais (ACP ou mais conhecida como PCA) é provavelmente a ferramenta mais usada em análise multivariada. Os objetivos da PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, detectar amostras anômalas, selecionar variáveis e fazer modelagens de classificação, enquanto simultaneamente retém a informação contida nos dados (HAIR et al., 2009). A PCA resulta de diferentes procedimentos matemáticos e é baseada principalmente em interpretações gráficas.

A PCA transforma as variáveis originais em novas variáveis chamadas de componentes principais, onde cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais. Geralmente duas ou três componentes principais são necessárias para explicar toda a informação presente nos dados, e assim, é possível identificar a verdadeira relação entre elas.

O modelo de uma componente principal no espaço de p -variáveis (p -dimensional) corresponde a uma reta, Figura 4, a qual deve passar pelo ponto central, que representa o conjunto de dados. A direção da componente principal é determinada de modo que os desvios sejam os menores possíveis no sentido dos mínimos quadrados. Esta primeira componente principal contém o máximo de variância unidimensional dos dados, isto é, ela define a direção que explica o máximo de informação estatística. Se uma reta não for suficiente para descrever os dados, adiciona-se uma segunda reta. Esta segunda componente principal é perpendicular a primeira e contém a maior variância dos pontos nesta direção. A terceira componente principal explica a maior variância total restante, sendo também ortogonal a primeira e a segunda componente principal. Este procedimento pode ser repetido até p vezes, quando os erros residuais se tornam iguais a zero. A variância explicada em cada componente principal é expressa em termos de autovalores (SCARMINIO, 1989; BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). A Figura 2.4 apresenta o esquema da sequência usado na análise de componentes principais

Figura 2.4 - Eixos das variáveis com três componentes principais.



Os métodos de análise de componentes principais aplicado foi o tipo-R ($\mathbf{X}^t\mathbf{X}$) que estuda a relação entre as variáveis. A PCA do tipo R decompõe a matriz \mathbf{X} em duas matrizes, a dos escores (\mathbf{T}) e a matriz dos loadings (\mathbf{P}), Equação 2,

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t \quad (2)$$

onde \mathbf{P}^t é a matriz transposta de \mathbf{P} .

Esta decomposição pode ser calculada através da diagonalização da matriz de covariância ou correlação (SCARMINIO, 1989).

O número de componentes principais necessário para descrever os dados são calculados de acordo com a quantidade máxima de variância acumulada ou determinados pela técnica de validação cruzada (SCARMINIO, 1989; BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). A Figura 2.5 apresenta o esquema da sequência usado na análise de componentes principais.

Figura 2.5 - Representação gráfica da análise de componentes principais.



2.2.4 Análise de Agrupamentos (AH)

A análise de agrupamentos ou análise de agrupamentos hierárquica (AH) é um grupo de técnicas multivariadas cuja finalidade principal é agregar objetos com base nas características que eles possuem, ou seja, classifica objetos de modo que cada objeto é semelhante aos outros no agrupamento com base em um conjunto de características escolhidas. Os agrupamentos resultantes de objetos devem então exibir elevada homogeneidade interna (dentro dos agrupamentos) e elevada heterogeneidade externa (entre agrupamentos). Assim, se a classificação for bem sucedida, os objetos dentro dos agrupamentos estarão próximos quando representados graficamente, e diferentes agrupamentos estarão distantes (HAIR et al., 2009).

É uma técnica de aprendizagem não supervisionada que examina as distâncias entre os pontos de todas as amostras com o objetivo de descobrir agrupamentos no conjunto de dados. A informação é representada na forma de um gráfico em duas dimensões, chamado de dendrograma. Cada amostra é tratada como um ponto no espaço p-dimensional. A escolha da distância para expressar a similaridade entre as amostras no conjunto de dados depende do tipo das variáveis usadas (HAIR et al., 2009).

A distância normalmente usada é a distância Euclidiana definida na Equação 3, a qual calcula as distâncias entre todos os pares de amostras. Cada distância é então convertida no valor de similaridade

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

onde, d_{ik} é a distância euclidiana entre os pontos i e k .

Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. Para amostras idênticas, $s_{ik} = 1$, enquanto que $s_{ik} = 0$ corresponde a dois pontos separados pela maior distância constatada no conjunto estudado. A similaridade é convenientemente definida pela Equação 4

$$s_{ik} = \left[1 - d_{ik} / (d_{ik})_{\text{máx}} \right] \quad (4)$$

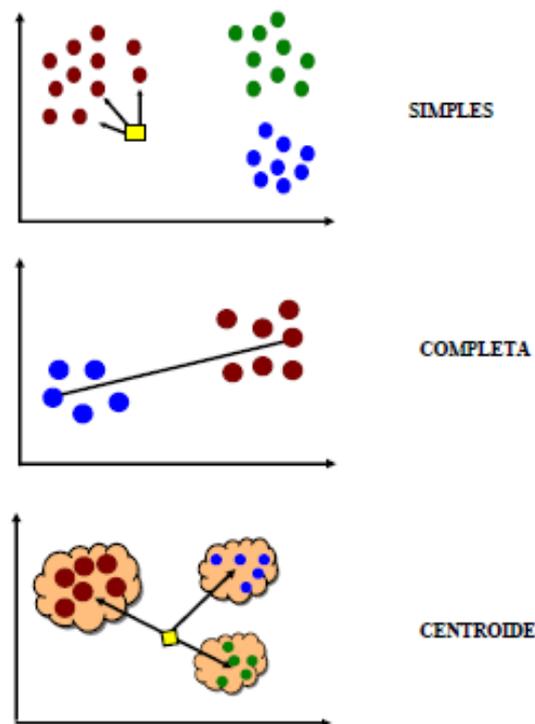
onde s_{ik} é a similaridade entre as amostras i e k , e $(d_{ik})_{\text{máx}}$ é a distância máxima entre dois pontos de um conjunto de dados no espaço p -dimensional.

Os valores de similaridade são colocados na forma de uma matriz. Os pontos mais similares são agrupados e o resultado é representado na forma de um dendrograma. Os valores correspondentes a estes pontos são substituídos na matriz na forma de grupos, os quais correspondem aos pares de pontos mais similares. Calcula-se uma nova matriz de similaridade, cuja dimensão é menor que a original. Este processo continua até que todos os pontos estejam contidos em um agrupamento, onde se pode visualizar as similaridades entre as amostras ou variáveis (HAIR et al., 2009).

Entre numerosas metodologias, os cinco algoritmos mais populares são ligação simples, ligação completa, ligação média, método centroide e método Ward. A Figura 2.6 mostra três maneiras para calcular as distâncias entre os pontos: ligação simples, completa e centroide. A ligação simples liga os pontos mais próximos do grupo. A ligação completa mede a distância entre dois grupos, e é definida como a distância máxima entre um ponto em um grupo e um ponto no outro. A ligação média calcula a média de cada agrupamento e faz a ligação. A ligação centroide calcula a distância entre todos os pares dos pontos, onde um membro de cada par pertence ao grupo. A média destas distâncias é usada para calcular a similaridade entre um dado ponto e o grupo (HAIR et al., 2009).

Neste trabalho foi aplicado o método de Ward (HAIR et al., 2009), no qual a similaridade entre dois agrupamentos não é uma única medida de similaridade, mas a soma dos quadrados dentro dos agrupamentos feita sobre todas as variáveis. Neste caso a seleção de qual par de agrupamentos a combinar é baseada em qual combinação de agregados minimiza a soma interna de quadrados no conjunto completo de agrupamentos separados. Esse procedimento tende a combinar agrupamentos com um pequeno número de observações, pois a soma de quadrados é diretamente relacionada com o número de observações envolvidas e, portanto, os padrões de agrupamento refletem agregados com aproximadamente o mesmo tamanho (HAIR et al., 2009).

Figura 2.6 - Tipos de ligações para formar um dendrograma, conexão simples, completa e centroide.



2.2.5 Modelagem de Misturas

Mistura é o ato ou efeito de associar vários ingredientes para formar um produto. O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus ingredientes e das proporções relativas dos mesmos, não da quantidade total da mistura. A

soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de q componentes, pode-se escrever, conforme Equação 5:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (5)$$

no qual x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só precisam fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100% (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

Como resultado da restrição da Equação 5 os valores de x_i (proporção do i -ésimo ingrediente), o espaço torna-se uma região simplex. Um simplex é uma configuração espacial determinada por um número de pontos a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos q pontos que determinam o simplex representam uma mistura no qual um dos q componentes assume a proporção 1.

Os modelos para misturas contendo mais de três componentes são simples extensões dos modelos para três componentes. Para o caso geral de q componentes, os modelos linear (Equação 6), quadrático (Equação 7) e cúbico especial (Equação 8) são dados respectivamente por

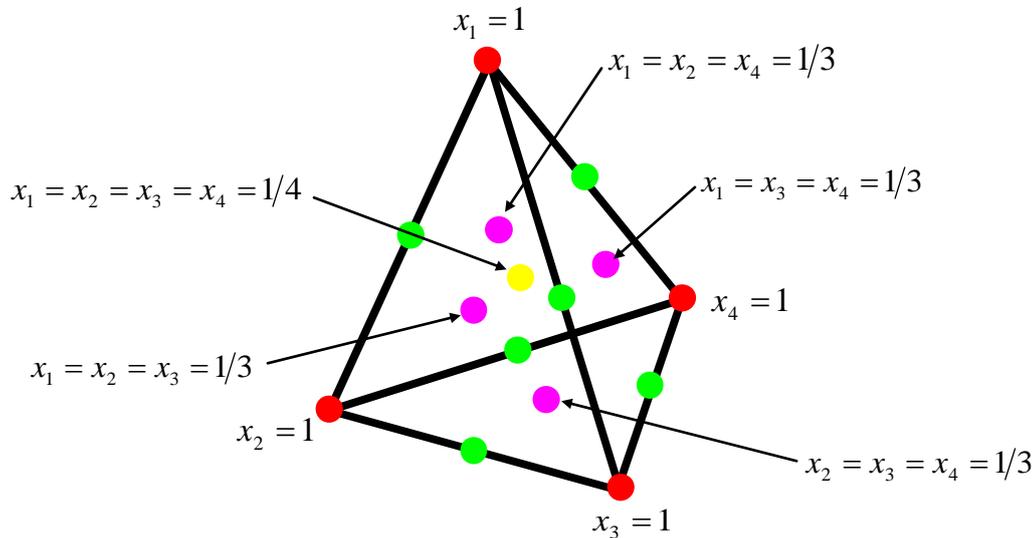
$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i \quad (6)$$

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j \quad (7)$$

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i<j}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k \quad (8)$$

A Figura 2.7 mostra um exemplo de um simplex com quatro componentes. As composições da mistura quaternária são representadas pelos pontos pertencentes ao tetraedro. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, em cada face do tetraedro os pontos representam misturas ternárias e no ponto central do tetraedro temos a mistura quaternária (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

Figura 2.7 - Planejamento centroide simplex para o estudo de misturas de quatro componentes.



Fonte: Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2002.

Além da restrição natural mostrada na Equação 5, pode-se também ter restrições dos limites superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, por motivos tecnológicos ou econômicos, entre outros.

2.3 EXTRAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURA

Uma das preocupações no processo extrativo é a recuperação das substâncias de forma a não produzir artefatos, sendo assim ela deve ser realizada de maneira cuidadosa, mesmo que isto possa acarretar em perda no rendimento.

Para escolher um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo, considerando a sua finalidade. Para o procedimento de extração foi escolhida a técnica de turbolização por 15 minutos pela simplicidade, rapidez e versatilidade. A turbolização ou turbo-extração é um procedimento de extração utilizado para preparação rápida de extratos vegetais. Baseia-se na redução drástica do tamanho da partícula e a rápida dissolução das substâncias. Isto é obtido através da aplicação de elevadas forças de cisalhamento, geradas no pequeno espaço compreendido entre o estator e um rotor de alta velocidade. A extração é realizada à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), devendo permanecer inferior a 40 °C.

Nos últimos anos, experimentos estatisticamente projetados estão sendo utilizados para minimizar o número de experimentos, bem como, identificar os efeitos de interação entre os fatores experimentais que podem ser importantes para otimizar procedimentos de extração (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2006). A preparação da amostra é a etapa mais importante no desenvolvimento das impressões digitais, porque a planta contém metabólitos que diferem amplamente em sua natureza química e quantidade (LONNI et al., 2003; 2005; 2012).

2.4 TECNOLOGIA COSMÉTICA

Vários aspectos devem ser considerados quando se desenvolve uma formulação de uso tópico para garantir sua qualidade, eficácia, segurança e sensorial agradável (RIBEIRO, 2006; LEONARDI et al., 2008). Os efeitos benéficos de extratos de *T. catigua*, assim como da formulação acrescida com este extrato, podem ter sua atividade limitada porque este extrato é facilmente oxidável, ficando susceptível à degradação, portanto, torna-se necessário promover a estabilidade da formulação. Para que este processo seja evitado, e a estabilidade do extrato seja aumentada, foi necessário proteger o extrato por meio de técnicas que promovam o encapsulamento do mesmo. Nesse caso, o sistema empregado foi o de emulsões múltiplas.

Emulsões múltiplas são sistemas complexos compostos por duas emulsificações, onde os dois tipos de emulsões, A/O (água em óleo) e O/A (óleo em água) ou O/A e A/O, existem simultaneamente, constituindo emulsões do tipo A/O/A (água em óleo em água), nas quais a fase interna é oleosa e possui gotículas de água dispersas em seu interior e emulsões do tipo O/A/O (óleo em água em óleo), nas quais a fase interna é aquosa e possui gotículas de óleo dispersas em seu interior (ASERIN, 2008). Essas emulsões apresentam aplicações nas áreas cosmética, farmacêutica e alimentícia, devido a capacidade de dissolver ou dispersar ativos nas diversas fases, veicular componentes incompatíveis e instáveis, além de possibilitar a liberação com perfil modificado de substâncias ativas (TADROS, 2000; HWANG et al., 2005; LOBATO-CALLEROS et al., 2006; OZER et al., 2007). Como desvantagem o sistema pode apresentar instabilidade termodinâmica, devido sua estrutura e, portanto, dificuldade de estabilização (URSICA et al., 2005). As emulsões podem ser preparadas de dois modos: emulsificação em uma ou duas etapas.

No desenvolvimento e caracterização das emulsões múltiplas do tipo A/O/A devem ser observados e realizados ensaios para os aspectos físico-químicos do processo de emulsificação e dos tensoativos empregados. As características físico-químicas determinadas

como: valores de pH, condutividade, densidade, teor de polifenóis, conformação e tamanho dos glóbulos, reologia e a influência de aditivos devem ser avaliados para que o sistema seja bem caracterizado e estabilizado (AVENDANO-GOMEZ et al., 2005). Além dos aspectos físico-químicos, análises qualitativas e quantitativas devem ser realizadas, devendo avaliar as variáveis relevantes à composição (tipo de fase oleosa, tensoativos empregados, valor de EHL, entre outros) e quanto ao método de emulsificação (temperatura de aquecimento das fases e de emulsificação, ordem de adição e velocidade de agitação).

Assim, e de acordo com os fatores avaliados, o processo de encapsulação pode ou não ser eficiente. Isto pode influenciar, por sua vez, no perfil de liberação para a emulsão múltipla.

2.4.1 Perfil de Liberação *in vitro*

A liberação de fármacos ou ativos pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual um fármaco ou ativo é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo.

A análise *in vitro* de liberação de fármacos e substâncias ativas é uma ferramenta importante, tanto no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos quanto no controle de qualidade. A permeação e liberação de substâncias ativas através da pele podem ser investigadas por metodologias *in vitro*, utilizando, para isto, células de difusão de Franz (1975). Esta análise tem sido utilizada como método de estimativa da penetração cutânea de fármacos e ativos, especialmente devido à dificuldade em realizá-los *in vivo*. Em 1975, estudos de Franz sobre absorção percutânea *in vitro* de doze compostos orgânicos utilizando pele humana, apresentaram boa correlação com os resultados comparados aos dos testes (FRANZ, 1975).

Os sistemas de liberação utilizando células de difusão de Franz modificadas (Figura 2.8) é uma variação dos métodos de dissolução que não usa cesta nem pá. O perfil de liberação é obtido pela coleta de solvente por meio de um canal de comunicação e o monitoramento contínuo de concentração liberada do fármaco. O resultado concentração-tempo é dependente do volume do solvente, da temperatura e agitação ou fluxo, e da membrana de acetato de celulose, buscando mimetizar a pele, que limita a concentração de ativo liberado. O equipamento é caracterizado por uma célula de difusão, na qual a pele ou membrana permanece em contato com uma solução receptora. A amostra adicionada ao sistema é difundida e o volume do compartimento receptor é suficiente para garantir uma solução homogênea e diluição da solução permeada. A temperatura do sistema é controlada e

mantida por um banho termostático que circula através de uma jaqueta que envolve a câmara receptora. A temperatura se mantém constante em toda célula por meio de agitação do sistema, alcançado por agitadores magnéticos. O sistema pode ser com fluxo estático ou contínuo, cuja solução receptora é bombeada continuamente a um fluxo constante através de uma bomba de infusão (SARTORELLI et al., 2000).

No sistema é adicionada uma membrana horizontalmente dividindo-a em dois compartimentos: doador e receptor. As membranas utilizadas podem ser de pele humana, pele de animal ou membranas permeantes. O uso de pele humana nestes estudos apresenta limitações inerentes às dificuldades de obtenção e às variabilidades individuais, além de requerer a aprovação do Comitê de Ética em Humanos (BENECH-KIEFFER et al., 2000). A pele suína, assim como, as membranas de celulose, são alternativas, uma vez que tem sido considerado um modelo relevante para a pele humana (SIMON; MAIBACH, 2000).

Figura 2.8 – Fotografia de Célula de Difusão de Franz modificada.



Fonte: Da autora.

Esses testes não substituem a necessidade de trabalho clínico, mas podem localizar com precisão, durante o desenvolvimento da formulação, os fatores que determinam a cinética de liberação do fármaco (BRUSCHI, 2006).

2.5 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO CUTÂNEA POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

A Espectroscopia Fotoacústica, abreviada por PAS do inglês Photoacoustic Spectroscopy, é uma técnica baseada no efeito fotoacústico e que permite avaliar *in vivo*, *ex-*

vivo, ou *in vitro* a propagação e distribuição de medicamentos ou cosméticos topicamente aplicados (SEHN et al., 2003; NUGLISCH; DIAS; SEHN; 2005; SEHN, SILVA; BENTO, 2005; PEDROCHI et al., 2005).

O efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de desexcitação não radioativo. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma. Esta variação é detectada pelo microfone que resulta no sinal fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente. Com esta técnica, é possível realizar a separação espectral dos diferentes constituintes das formulações que contribuírem para a absorção óptica, descrita pelo espectro total do sistema. Além disso, uma das características únicas deste método é a possibilidade de se determinar o perfil de penetração das substâncias ao longo da espessura da amostra sob teste.

Outra vantagem da PAS é que por ser uma técnica muito sensível, ela permite detectar a presença de baixas concentrações dos componentes absorvedores na amostra. Além disso, o método é não destrutivo permitindo que a amostra testada seja reutilizada para outros ensaios, a não ser que a amostra tenha algum outro efeito degradável na presença de luz.

Estudos anteriores (SEHN et al., 2003; SEHN; SILVA; BENTO, 2005; NUGLISCH; DIAS; SEHN, 2005; PEDROCHI et al., 2005) já demonstraram a potencialidade da técnica fotoacústica para o estudo da penetração de fármacos e protetores solares na pele de humanos e de cobaias. Como exemplo destes, inclui a determinação da penetração do dimetilsulfóxido (DMSO) através da pele *in vitro* (BAESSO; SNOOK; ANDREW, 1994), a veiculação de protetores solares na pele humana e em pele de ratos *in vivo* (SEHN et al., 2003; SEHN; SILVA; BENTO, 2005; PEDROCHI et al., 2005; DOS ANJOS; ROMPE; MANSANARES, 2005; BERBICZ et al., 2011), a penetração de antifúngicos na unha humana *in vitro* (NUGLISCH; DIAS; SEHN, 2005), a penetração de loção capilar de *Guazuma ulmifolia* (mutamba) em pele de ratos (ROCHA et al., 2007), entre outros.

No estudo da pele, o primeiro relatório do uso de espectroscopia fotoacústica foi por espectroscopia de infravermelho Transformada de Fourier, onde foi avaliado a penetração de dimetilsulfóxido em pele de porco *in vitro* por Baesso e colaboradores (1994). A utilização de espectroscopia fotoacústica na investigação da pele também foi expandido para aplicações terapêuticas, evidenciando a importância desta técnica nesta área (BECKMANN et al., 2002). Truitte e colaboradores (2007) avaliaram a penetração cutânea e ativação de melanina de uma

formulação fitoterápica para vitiligo, nos quais, os resultados mostraram a capacidade da técnica para quantificar as taxas de penetração de substâncias, permitindo obter informações, inclusive, sobre a eficiência dos promotores de permeação utilizados nessas formulações.

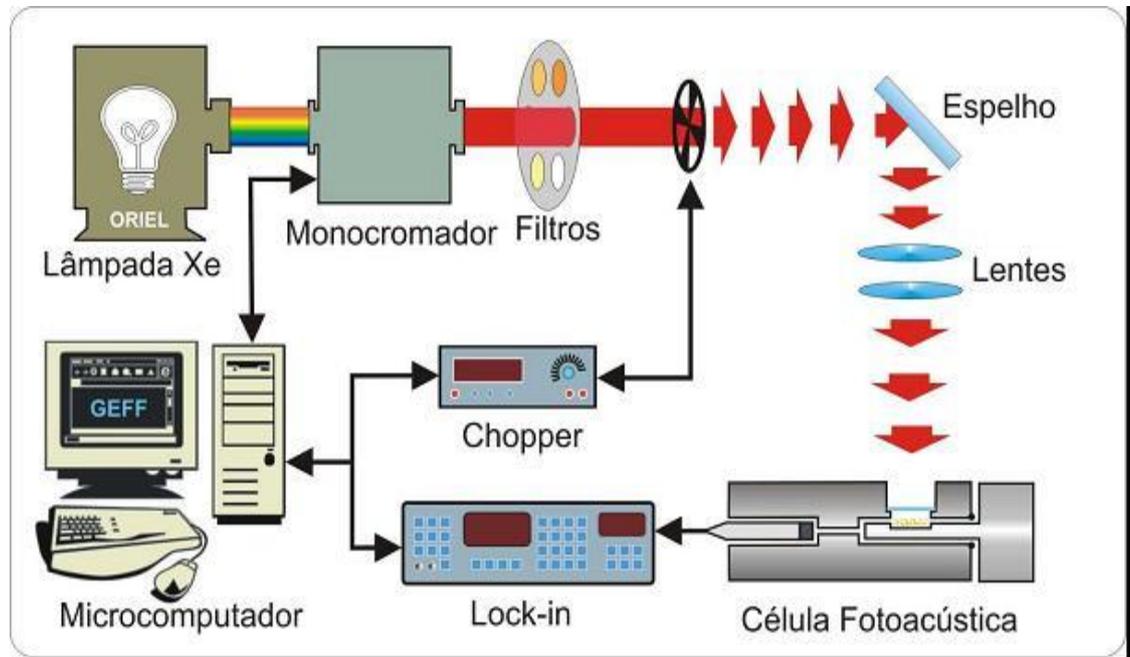
Conforme pode ser observado na Figura 2.9, a fração de luz, incidente na amostra, é absorvida pelas moléculas gerando calor. Este calor gerado pode chegar até a superfície da amostra e contribuir para o sinal fotoacústico, dependendo da profundidade do ponto de geração e da frequência de modulação da luz utilizada. O comprimento de difusão térmica, μ_s , é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode se propagar até a superfície e contribuir para a geração do sinal fotoacústico. Esse comprimento é definido pela seguinte expressão (equação 9):

$$\mu_s = (D / \pi f)^{1/2} \quad (9)$$

em que μ é o comprimento de difusão térmica (cm), D é a difusividade térmica (cm^2/s) e f é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz que vai iluminar a amostra sob teste. Portanto, mudando a frequência de modulação, o comprimento de difusão térmica pode ser alterado de tal forma que um perfil de profundidade possa ser obtido. Assim, quando se aplica uma substância sobre a pele e ela penetra através da superfície, o sinal fotoacústico pode revelar até onde a substância foi absorvida (dependendo da espessura da amostra). Esse procedimento tanto pode ser realizado com apenas um comprimento de onda, na banda de absorção da substância, quanto em toda a faixa espectral disponível, analisando-se o sinal em cada comprimento de onda.

Ao incidir radiação modulada sobre um material, ocorrem processos de transferência da energia térmica que são gerados nos pontos da amostra onde a radiação foi absorvida. A transmissão de energia térmica para o resto do material, através da condução, caracteriza a difusão térmica (D).

Figura 2.9 - Esquema demonstrando a configuração experimental da espectroscopia fotoacústica



Fonte: Sehn et al., 2003.

2.6 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor, o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso. A busca dessa segurança deve incorporar permanentemente o avanço do estado da arte da ciência cosmética (BRASIL, 2003).

Antes da disponibilização de produtos cosméticos no mercado, é importante além do estudo de qualidade e eficácia de seus princípios ativos, verificar alguns parâmetros, tais como: absorção cutânea, estudo do potencial de efeito sistêmico, estudo do potencial de efeito alérgico e estudo do potencial de risco irritativo (BRASIL, 2003).

Os testes de segurança que envolvem a utilização de produtos de uso tópico são realizados em animais (*in vivo*) ou alternativamente *in vitro*. Testes realizados em orelhas de coelhos têm sido realizados desde a década de 50, e produtos encontrados sem atividade irritativa e comedogênica nos testes em orelhas de coelhos apresentam bastante semelhança com modelos humanos (KLIGMAN; KWONG, 1979; FULTON; PAY; FULTON JR., 1984; BRASIL, 2003).

De forma geral, as reações que acometem a pele dos coelhos apresentam bastante semelhança com as observadas na pele humana, tais como descamação, eritema (alteração cutânea que dá lugar a vermelhidão da pele), formação de comedos (obstrução do folículo piloso por um tampão córneo de queratina), hiperqueratose (espessamento ou hipertrofia do estrato córneo), acantose (aumento da espessura do estrato espinhoso) e presença de infiltrados inflamatórios (LOPES et al., 1987).

2.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Um fitocosmético deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade durante toda sua vida útil. A estabilidade é necessária para assegurar a qualidade do fitocosmético, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (ICH, 2003; BRASIL, 2004, 2005; BABY et al., 2007).

As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento: incompatibilidade física e incompatibilidade química, como, por exemplo, pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise, interação entre ingredientes da formulação e o material de acondicionamento.

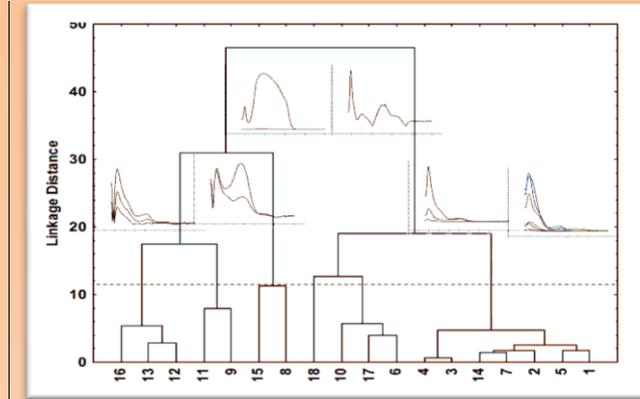
O teste de estabilidade acelerada tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento num período de tempo menor. Emprega condições não extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação. É um estudo preditivo e pode ser usado para estimar o prazo de validade, mas pode ser empregado, ainda, quando houver mudanças na composição ou no processo de fabricação, na embalagem primária ou para validar equipamentos e, também, no caso de fabricação terceirizada (BRASIL, 2004; 2005).

Assim, por definição o estudo de estabilidade acelerado, é o estudo projetado para acelerar as degradações químicas, biológicas e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento, enquanto o estudo de estabilidade

cumulativa é o que determina o efeito do período de estocagem do princípio ativo, produto intermediário e/ou produto a granel sobre a qualidade do produto biológico terminado.

Já o estudo de estabilidade de longa duração é projetado para avaliação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade estipulado e recomendar as condições de armazenamento, enquanto o estudo de estabilidade de longa duração parcial avalia a estabilidade de longa duração com resultados parciais, cuja avaliação final deverá ser informada do histórico de mudança, se houver (BRASIL, 2011).

Estudos iniciais, portanto devem ser realizados com o produto em condições de degradação acelerada, para se conhecer, rapidamente, toda e qualquer alteração que possa ocorrer com o produto final e/ou produtos intermediários, se for o caso.



CAPÍTULO 3

ARTIGO A

Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*

Audrey Alesandra Stingen Garcia Lonni, Renata Longhini, Gisely Cristiny Lopes, João Carlos Palazzo de Mello, Ieda Spacino Scarminio. *Analytica Chimica Acta* 719 (2012) 57– 60. doi:10.1016/j.aca.2011.12.053.

Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni¹, Renata Longhini¹, Gisely Cristiny Lopes¹, João Carlos Palazzo de Mello¹, Ieda Spacino Scarminio²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil.

²Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, BR-86051-970, Londrina, PR, Brazil.

Correspondence author: Dr. Ieda Spacino Scarminio, *Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP6001, BR-86051-990, Londrina, PR, Brazil*

E-mail: ieda@qui.uel.br

Tel: +55-043-3371-4286; fax: +55-043-3371-4286

Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*

Resumo

Modelo estatístico de misturas de água, metanol, acetona e etanol foram usados para extrair substâncias de cascas de *Trichilia catigua* (Meliaceae) para avaliar os efeitos de diferentes solventes e suas misturas sobre o seu rendimento, teor de polifenol total e atividade antioxidante. Os resultados experimentais e os seus modelos de superfície de resposta mostraram que as misturas quaternárias com proporções aproximadamente iguais de todos os quatro solventes promoveram o maior rendimento, teor de polifenol total e atividade antioxidante dos extratos brutos, seguido das misturas ternárias do modelo. Análise de componente principal e análise de agrupamento hierárquico dos espectros de HPLC-DAD dos picos cromatográficos da mistura água-metanol-acetona-etanol 1:1:1:1 indicam a presença de cinchonafinas, derivados de ácido gálico, polifenóis naturais, flavonoides, catequinas, e epicatequinas.

Palavras Chave: *Catuaba/ Otimização da extração/ Modelagem de mistura/ Sistema Simplex Centroide/ Cascas de Trichilia catigua*

Abstract

Statistical design mixtures of water, methanol, acetone and ethanol were used to extract material from *Trichilia catigua* (Meliaceae) barks to study the effects of different solvents and their mixtures on its yield, total polyphenol content and antioxidant activity. The experimental results and their response surface models showed that quaternary mixtures with approximately equal proportions of all four solvents provided the highest yields, total polyphenol contents and antioxidant activities of the crude extracts followed by ternary design mixtures. Principal component and hierarchical clustering analysis of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks of 1:1:1:1 water-methanol-acetone-ethanol mixture extracts indicate the presence of cinchonains, gallic acid derivatives, natural polyphenols, flavanoids, catechins, and epicatechins.

Keywords: *Catuaba/ Extraction optimization/ Mixture modeling/ Simplex-centroid design/ Trichilia catigua barks*

3.1 Introduction

In recent years several studies have been conducted in order to investigate the antioxidant activity of vegetal material. Natural antioxidants not only protect lipids from oxidation in food, but also provide health benefits associated with preventing oxidative damages owing to biological degeneration. This oxidative damage plays a pivotal role in aging as well as in several degenerative diseases. Polyphenolic compounds, flavonoids, tannins, anthocyanins, and other phenolic constituents are among the most studied antioxidant classes.

In this study *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) was analyzed. *T. catigua* is a native plant that grows abundantly in several regions of Brazil. It is popularly known as catuaba or catiguá and is widely used in folk medicine as a tonic for the treatment of impotence, fatigue, stress and memory deficits. Chemical studies have indicated the presence of omega-phenyl alkanes, omega-phenyl alkanolic acids, omega-phenyl-gamma-lactones, alkyl-gamma-lactones, alkenyl-gamma lactones, fatty acids, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, tannins and a mixture of flavalignans, in *T. catigua* extracts [1]. The crude extract and isolated substances (epicatechin, cinchonans Ia, Ib, IIa, IIb, catiguanins A and B, and procyanidins B2 and C1) from *T. catigua* bark showed antioxidant activity and free radical scavenging potential on 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and the reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form [2,3]. Whereas these secondary metabolites usually occur in low concentrations, the choice of extraction solvent affects both the yield [4] and the number of potential antioxidant metabolites that can be detected in metabolomic analysis [5,6].

To obtain complete extraction, the ideal solvent is obviously one that presents maximum selectivity, has the best capacity for extraction in terms of the saturation coefficient of the product in the medium, and is compatible with the properties of the material to be extracted [7].

In the literature, different solvent systems have been used for the extraction of secondary metabolites from plant materials, because their extraction efficacy depends on their chemical nature. For example, ethyl alcohol extracts a large number of flavonoids whereas terpenes can be selectively extracted at neutral pH with ethyl acetate or aliphatic ketones. Aqueous mixtures of ethanol, methanol and acetone have been used for extraction of polyphenols from vegetal material, but no single solvent could extract all the antioxidants with their different polarities [8].

Although the literature shows many studies on aqueous mixtures of pure organic solvents, no investigations of these solvent systems were found using statistical mixture designs.

In this work a simplex centroid mixture design involving water, methanol, acetone and ethanol has been applied to the extraction of total material from *Trichilia catigua* barks. Mixture design models assessing the importance of the effects of solvents and their mixtures on the yields of crude extracts, their antioxidant activities and total polyphenol contents are determined with the aim of optimizing the extraction procedure. Principal component and hierarchical clustering analyses (PCA and HCA) are applied to the high performance liquid chromatographic-diode array detector (HPLC-DAD) data in order to identify classes of compounds detected by the most promising *Trichilia catigua* barks fingerprint of the mixture design.

3.2 Experimental

3.2.1 General experimental procedures

All the reagents used were special or HPLC grades (Mallinckrodt, Philipsburg, USA). Mixture preparations were made using water prepared with the Millipore Milli-Q Gradient purification System.

3.2.2 Plant material

In this study barks of *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae) were collected in São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brazil (2008) and a voucher specimen was identified by Dr. Gerdt Guenther Hatschback and deposited at the Herbarium of Curitiba Town Hall under number 306253, Curitiba, PR, Brazil. The samples were donated by Laboratory Catarinense S/A, having lot number 21828.

3.2.3 Extract preparation

Air-dried stem barks (20.0 g) were powdered and extracted with 200.0 mL of solvent, according to the compositions specified in the experimental design by turbo-extraction (Ultraturrax® model UTC115KT, USA) for 15 min at 40 °C±2 °C. Next, the crude extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure, and then lyophilized.

3.2.4 Radical-scavenging activity (RSA) assay

The free radical scavenging activities of extracts of *T. catigua* were measured by using 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) [9]. Solutions of each crude extract, Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma) and Vitamin C (ascorbic acid, Delaware, Brazil) at different concentrations (1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were dissolved in 3 mL of methanol and then added to a methanolic solution of free radical DPPH (1 mmol L^{-1} , 375 μL). The absorbance of the resulting solution was read spectrophotometrically (Ocean Optics UV/VIS CHEM2000, EUA) at 516.99 nm. Tests were carried out in triplicate. The results are reported as the mean \pm standard deviation of the 50% inhibition (IC_{50}) (Table 3.1).

Table 3.1 – Proportions of solvents for mixtures in the extraction procedure and determination of mass yield, total polyphenol content and antioxidant capacity (IC_{50}) in the crude extracts of *Trichilia catigua* barks.

Crude Extract	Extracts (solvent proportions)	Mass yield (%)	Polyphenol content (%)	Antioxidant capacity (IC_{50})
01	w (1)	13.17 \pm 0.18	35.77 \pm 0.73	5.76 \pm 0.05
02	m (1)	14.00 \pm 0.09	48.31 \pm 0.55	6.21 \pm 0.04
03	a (1)	9.80 \pm 0.04	38.69 \pm 0.14	4.95 \pm 0.03
04	e (1)	9.42 \pm 0.02	43.66 \pm 0.46	4.68 \pm 0.10
05	w:m (1/2:1/2)	16.04 \pm 0.03	43.34 \pm 0.26	5.59 \pm 0.06
06	w:a (1/2:1/2)	18.76 \pm 0.18	44.05 \pm 1.09	5.60 \pm 0.04
07	w:e (1/2:1/2)	15.74 \pm 0.02	43.68 \pm 0.81	5.52 \pm 0.11
08	m:a (1/2:1/2)	16.52 \pm 0.02	41.54 \pm 0.40	5.51 \pm 0.05
09	m:e (1/2:1/2)	16.06 \pm 0.02	42.25 \pm 0.63	4.81 \pm 0.08
10	a:e (1/2:1/2)	13.42 \pm 0.02	46.56 \pm 0.96	4.95 \pm 0.05
11	w:m:a (1/3:1/3:1/3)	18.74 \pm 0.02	46.04 \pm 0.46	4.85 \pm 0.09
12	w:m:e (1/3:1/3:1/3)	18.13 \pm 0.01	46.57 \pm 0.74	5.29 \pm 0.06
13	w:a:e (1/3:1/3:1/3)	18.23 \pm 0.01	46.65 \pm 0.30	5.87 \pm 0.11
14	m:a:e (1/3:1/3:1/3)	17.74 \pm 0.02	46.46 \pm 0.17	5.58 \pm 0.04
15	w:m:a:e (1/4:1/4:1/4:1/4)	19.94 \pm 0.04 ^b	50.84 \pm 0.57 ^a	4.59 \pm 0.01 ^a

w=water; m=methanol; a=acetone; e=ethanol

^aMeans and standard deviations of 5-fold replicates.

3.2.5 Determination of total phenolic and total tannin contents

The total phenolic content was determined according to the European Pharmacopoeia spectrophotometric method [10]. Stock solution was prepared from each lyophilized crude extract (0.15 g) of powdered sample mixed with 250 mL of water and pyrogallol solution. The absorbance of the resulting solution was read spectrophotometrically (Shimadzu UV/VIS PC-1650, Japan) at 760 nm. Tests were carried out in triplicate. The results are reported as the mean \pm standard deviation of the total phenolics or total tannins (Table 3.1).

3.2.6 HPLC analysis

HPLC analysis was conducted on a Thermo Model LC Pump Plus liquid chromatograph equipped with a Finnigan Surveyor PDA Plus diode array detector. A C18 110A ODSPN Phenomenex column (250 x 4.6 mm), 5 μ m particle size, was used for separation throughout this study, with a flow rate of 1 mL min⁻¹. Each sample was prepared in a 500 μ g mL⁻¹ solution, according to the experimental design and filtered with a 0.20 μ m Millipore[®] filter. A 20 μ L aliquot of this solution was injected into the HPLC (loop 20 μ L). The mobile phase contained a mixture of 75.0% water, 12.5% methanol (MeOH) and 12.5% acetonitrile (ACN). The temperature was fixed at 35 °C. Reference standards (catechin, 99% purity and epicatechin, 95% from Sigma; procyanidin B2, and cinchonains Ia, Ib, IIa, and IIb, isolated from *T. catigua* [3] were used to identify the major components in the crude extract. The temperature was fixed at 25 °C. Elution was monitored at 210, 254, and 280 nm, of these, the 210 nm detection provided the largest number of signals. Satisfactory separation was achieved in 15 min.

3.2.7 Computer programs

Mixture response surfaces [11], principal component and hierarchical cluster analysis [12] calculations were carried out using the software Statistica 8.0. PCA and HCA were carried out using a standardize columns matrix.

3.3 Results and discussion

Table 3.1 shows the effects of the solvent compositions on the yield of crude extracts of *Trichilia catigua* barks. By comparing the average of the crude extract yields, in general one can notice that the yields increased in the following order, pure solvents (11.56 \pm 2.32), binarysolvent mixtures (16.09 \pm 1.71), ternary solvent mixtures (18.21+0.41), and quaternary

solvent mixtures (19.94±0.04). By comparing the crude extract yields, one can notice that pure acetone, pure ethanol and water solvents, and acetone-ethanol mixture presented lowest extraction yields. Note that the highest yield values were obtained when extractions were performed with the quaternary solvent mixtures that have maximum yields, followed by the water-acetone binary and all the ternary mixtures. Water and pure acetone presented the lowest polyphenol contents whereas maximum content values were obtained with the quaternary solvent mixture following by pure methanol, the acetone-ethanol binary and all the ternary mixtures. A lower value of IC₅₀ indicates a higher antioxidant activity. It is interesting to notice that higher antioxidant activities were also obtained with the quaternary solvent mixtures. On the other hand, although pure acetone and pure ethanol solvents presented lower extraction yields, they presented lower value of IC₅₀ compared with water and pure methanol, as well as the ternary mixtures.

Response surfaces were determined for yield, total polyphenol content and antioxidant activity as a function of the extraction solvent compositions. In all cases, linear, quadratic and special cubic models were tested. Lack of fit for these surfaces was evaluated with ANOVA and confirmatory experiments were performed in the region previously considered to have desirable results.

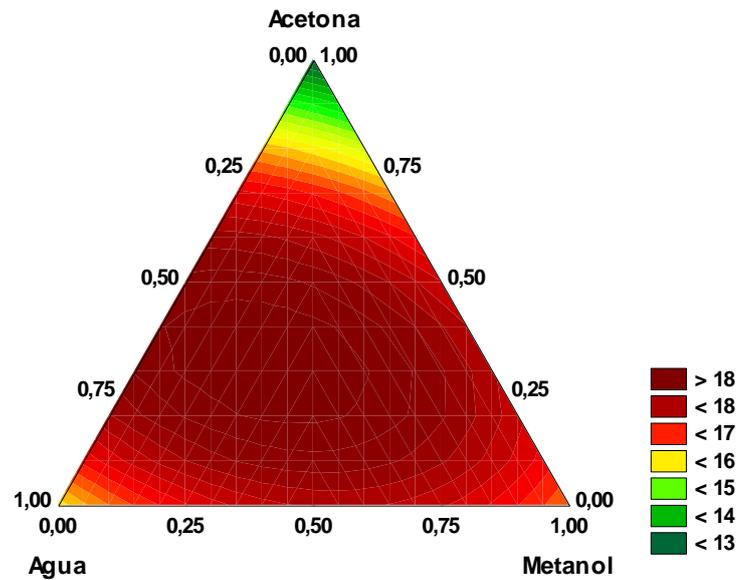
The quadratic model for yield showed no significant lack of fit at the 95% confidence level and is given by (1)

$$\begin{aligned}
 \mathbf{Yield} = & 13.0 \mathbf{w} + 13.8 \mathbf{m} + 9.7 \mathbf{a} + 9.2 \mathbf{e} + 11.5 \mathbf{wm} + 30.2 \mathbf{wa} \\
 & (\pm 0.7) \quad (\pm 0.7) \quad (\pm 0.7) \quad (\pm 0.7) \quad (\pm 2.9) \quad (\pm 2.9) \\
 & + 20.1 \mathbf{we} + 20.2 \mathbf{ma} + 20.4 \mathbf{me} + 17.6 \mathbf{ae} \\
 & (\pm 2.9) \quad (\pm 2.9) \quad (\pm 2.9) \quad (\pm 2.9)
 \end{aligned} \quad (1)$$

As can be seen on comparison of the model coefficient values with their standard errors all the binary effects are synergic and significant. The binary mixtures are more efficient for producing yields than would be expected based on the additive properties of their pure components. The water:acetone interaction is the most important having the largest binary value. Water:ethanol, methanol:acetone, methanol:ethanol, and acetone:ethanol have more moderate and essentially equivalent interaction effects. The water:methanol interaction coefficient is smallest but significant at the 95% confidence level. Of the pure solvents highest yields are obtained by water and methanol whereas acetone and ethanol produce much smaller yields.

The response surface for yield is shown in Figure 3.1 as a function of the water, methanol, and acetone proportions with a constant 25% ethanol composition. The highest yield value on the contour graph is seen to occur with equivalent proportions of all four solvents.

Figure 3.1. Response surface contour plot of the special cubic model predicted yield as a function of the acetone, water and methanol proportions for 25% ethanol.



ANOVA applied to the linear, quadratic and even special cubic models showed significant lack of fit at the 95% confidence level for total polyphenol content. The special cubic model is given by (2):

$$\begin{aligned}
 \text{Polyphenol} = & 38.8w + 48.3m + 38.7a + 43.7e + 26.1wa + 14.6we \\
 & (\pm 0.53) \quad (\pm 0.53) \quad (\pm 0.53) \quad (\pm 0.53) \quad (\pm 2.57) \quad (\pm 2.57) \\
 & - 9.0ma - 16.1me + 20.3ae + 98.1wma + 123.2wme \quad (2) \\
 & (\pm 2.57) \quad (\pm 2.57) \quad (\pm 16.6) \quad (\pm 16.6) \quad (\pm 16.6) \\
 & + 36.4wae + 116.1wmae \\
 & (\pm 16.6) \quad (\pm 16.6)
 \end{aligned}$$

The water:acetone, water:ethanol, acetone and ethanol binary effects are all synergic whereas the methanol:acetone and methanol:ethanol contributions are antagonistic. All the ternary model coefficients are significant and provide synergistic contributions to the total polyphenol content. A confirmatory experiment in triplicate was performed with the 30%

water and 70% acetone mixture since this composition had previously been shown to result in high total polyphenol content. The above model predicts a total phenol content of 43.3% in good agreement with the 45.0% average yield of the triplicate results showing that the lack of model fit is probably more serious in the region of the center point of the mixture design.

This model lack of fit can be understood upon examination of the total polyphenol values in Table 1. The largest polyphenol content occurs at the center point quaternary mixture. It extracts 2.5% more polyphenol than any other solvent mixture. As such a quaternary term had to be included to obtain an accurate model. In any case, these calculations indicate the importance of the ternary and quaternary interactions and lead to the conclusion that the optimum solvent composition for extracting polyphenols is a quaternary mixture with significant proportions of all solvents.

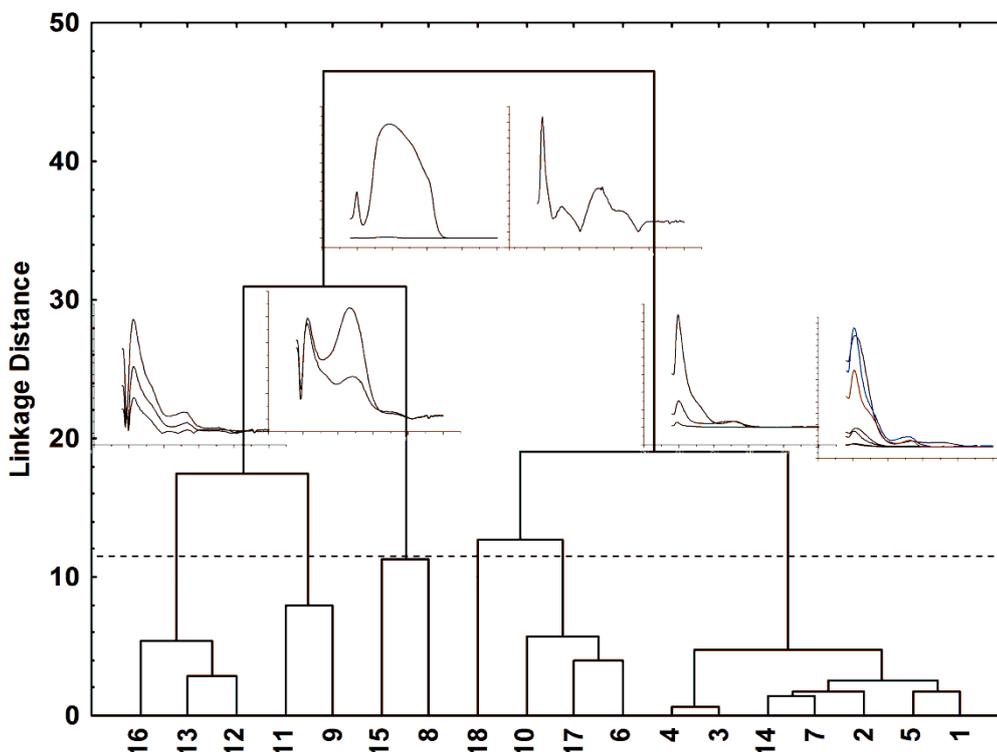
Linear, quadratic and special cubic models of antioxidant activity all had significant lacks of fit. The confirmation triplicate at 30% water and 70% acetone had an average of 4.67 ± 0.03 whereas the antioxidant predict activity was somewhat higher, 5.36. The model indicates that the water:methanol:acetone ternary interaction is fundamental for obtaining desirable antioxidant activity.

PCA and HCA were applied to the spectral profiles of the apices of each peak for all the extracts obtained with the mixture design. Since the center point extract provided the highest antioxidant activity, yield and spectral profiles are reported here.

The data matrix had dimensions of 18×211 corresponding to the spectra of each chromatographic peak and the 190-400 nm wavelength interval. The corresponding 18×18 matrix containing all the interpoint distances for this 211 dimensional space was determined and HCA was carried out. PCA was also made on the spectral matrix complementing the HCA results detailed below.

Figure 2 shows the HCA dendrogram. Examination of the spectra indicate the existence of 5 to 7 different types of characteristic spectra corresponding to linkage distances between 8 and 18. The spectra shown in Figure 3.2 are classified into six different groups and are discussed in more detail below.

Figure 3.2. Hierarchical analysis dendrogram of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks of the 1:1:1:1 water, methanol, acetone, and ethanol extraction mixture.



The group of spectra on the left corresponding to the 12th, 13th and 16th chromatographic peaks shows the most intense band at 207 nm, a shoulder at 225 nm and a weak band at 280 nm. These spectra are similar to characteristic spectra of the Cinchonain II family [13].

The second group on the right has maximum absorbances at 207 and 267 nm. These bands are found to occur in the spectra of gallic acid derivatives [14].

The spectra shown on the top left contains one broad band that has a profile consistent with the electronic structures of natural polyphenols that can include simple molecules like the phenolic acids to highly polarizable compounds such as the tannins [15].

The peak with the longest retention time has the spectra shown on the top right. The sharp intense band at 197 nm, weaker bands at 225 and 277 nm, and the shoulder at 316 nm are characteristic of the flavonoids [16].

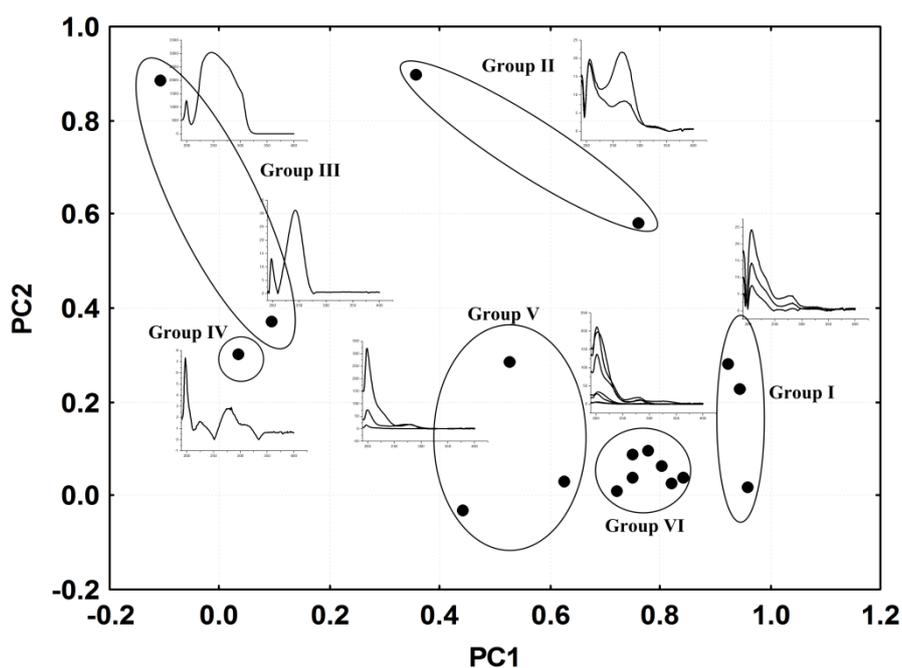
The second group from the right shows stronger bands at 202 nm and weaker ones at 278 nm. These spectra are similar to those of the condensed tannins [17].

Finally the spectra of the large group located on the far right have their strongest band at 197 nm with weaker bands at longer wavelengths, 280 nm. These spectra are similar to those of the catechins and epicatechins.

To obtain a visualization of the information content of the spectra, the PCA was used. The first two principal components explain 86.7% of the total variance. The first PC described 73.3% of the variance and the second 13.4%.

The score plot of PC1 against PC2 is shown in Figure 3.3. An inspection of the score plot confirm the existence of six types of spectra characteristic of different groups of metabolites. Group I is similar to the spectra of the Cinchonain II family, group II is similar to the spectra of gallic acid derivatives. Group III is consistent with the natural polyphenols and the group IV is characteristic of the flavonoids. Group V contains spectra similar to those of the condensed tannins and finally the group VI the spectra are similar to those of the catechins and epicatechins. The results are consistent with that of the hierarquical analysis.

Figure 3.3. Score plot of PC1 against PC2 of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks of the 1:1:1:1 water, methanol, acetone, and ethanol extraction mixture.



3.4 Concluding remarks

This study indicated that quaternary mixtures with approximately equal proportions of water, methanol, acetone, and ethanol from *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) barks resulted in higher yields of crude extract, total polyphenol content, and antioxidant activity. Antioxidant activity with values less than 5.0 also were obtained with pure ethanol following by the methanol:ethanol and acetone:ethanol binary mixture, water:methanol:acetone ternary mixture, and pure acetone. A comparative study of the HPLC-DAD spectra of the chromatographic peaks indicated the presence of cinchonains, gallic acid derivatives, natural polyphenols, flavanoids, catechins and epicatechins. Although the quaternary mixture has shown better antioxidant activity, studies should be conducted to quantify the contribution of each these individual compounds in biological systems, mainly in the extracts that showed activity less than 5.0.

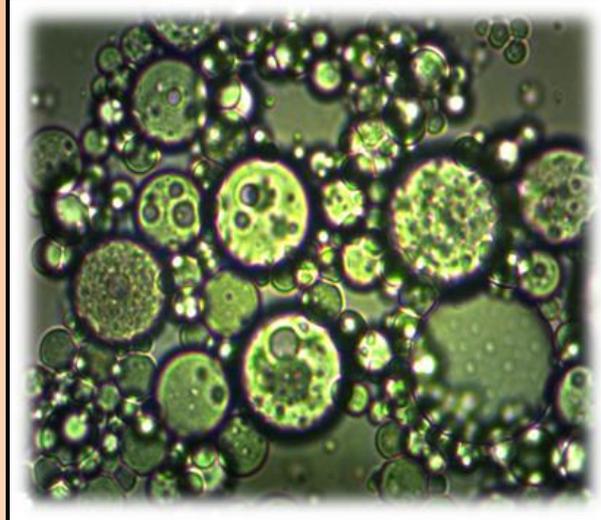
Acknowledgements

This work was support by the Brazilian granting agencies CNPq, CAPES/Proap, INCT_if, and Fundação Araucária. The authors are grateful to Dr. Roy Edward Bruns for the English language revision. We wish to thank Dra. Andréa Diniz for helpful discussions.

References

- [1] M.G. Pizzolatti, A.F. Venson, A.J. Smânia, E.F.A. Smânia, R. Braz-Filho, Z. Naturforsch. 57 (2002) 483–488.
- [2] W. Tang, H. Hioki, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama, J. Nat. Prod. 70 (2007) 2010–2013.
- [3] F.O. Resende, E. Rodrigues-Filho, H. Luftmann, F. Petereit, J.C.P. Mello, J. Braz. Chem. Soc. 22 (2011) 2087–2093.
- [4] P.K. Soares, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, J. Sep. Sci. 32 (2009) 644–652.
- [5] A.A. Almeida, I.S. Scarminio, J. Sep. Sci. 30 (2007) 414–420.
- [6] C.N. Borges, R.E. Bruns, A.A. Almeida, I.S. Scarminio, Anal. Chim. Acta 595 (2007) 28–37.
- [7] R.O.B. Wijesekera, The Medicinal Plant Industry, CRC Press Inc., Florida, 1991.
- [8] P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Molecules 15 (2010) 8813–8826.
- [9] R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J.A. Weil, Food Chem. 84 (2004) 551–562.

- [10] European Pharmacopoeia, Determination of Tannins in Herbal Drugs, sixth ed., European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, 2007.
- [11] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B.B. Neto, Statistical Design: Chemometrics, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [12] A.C. Rencher, Methods of Multivariate Analysis, second ed., John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York, 2002.
- [13] Y. Matsuo, Y. Fujita, S. Ohnishi, T. Tanaka, H. Hirabaru, T. Kai, H. Sakaida, S. Nishizono, I. Kouno, Food Chem. 121 (2010) 1073–1079.
- [14] S.C. Verma, S. Nigam, C.L. Jain, P. Pant, M.M. Padhi, Chem. Sin. 2 (2011) 268–277.
- [15] K. Yamagushi, Spectral Data of Natural Products, Elsevier, New York, 1970.
- [16] B.A. Bohm, Introduction to Flavonoids: Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products, second ed., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1998.
- [17] S.G. Verza, C. Pavei, G.G. Ortega, J. Braz. Chem. Soc. 19 (2008) 1627–1633.



CAPÍTULO 4

ARTIGO B

Multiple Emulsion as plat form to delivery

***Trichilia catigua* (Catuaba) Extract:**

Development and Characterization

**Multiple Emulsion as plat form to Delivery *Trichilia catigua* (Catuaba) Extract:
Development and Characterization**

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni

Gisely Cristiny Lopes

Vanessa Marquito Munhoz

Ieda Spacino Scarminio

Marcos Luciano Bruschi

João Carlos Palazzo de Mello

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR,
Brazil.

Corresponding author: Dr. João Carlos Palazzo de Mello, Pharmacy Department, State
University of Maringa, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil

E-mail address: mello@uem.br

Tel: +55 44 3011-4816

Fax: +55 44 3011-5050

Resumo

Emulsões múltiplas (EM) contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* (ETC) foram preparadas por método de emulsificação de inversão de fases. O sistema consistiu de fase aquosa, fase oleosa (emolientes e dois surfactantes) e ETC. Três emolientes (óleo de andiroba, buriti e canola) e ETC nas concentrações de 0,5% (p/p) e 1,0% (p/p) foram avaliados. As EMs foram caracterizadas em relação ao aspecto macroscópico e microscópico. Após os testes de caracterização, foram selecionadas as formulações preparadas a partir de óleo de canola com e sem ETC. As micelas de canola apresentaram morfologia regular, com diâmetro médio de 277,22 nm (sem ETC), 306,85 nm com 0,5%, p/p e 323,48 nm com 1,0% p/p de ETC, e boa eficiência foi obtida no aprisionamento de ETC. As formulações também foram submetidas a reometria (fluxo) e avaliação *in vitro* do perfil de liberação. As formulações apresentaram fluxo não-newtoniano e pseudoplástico com tixotropia mínimo. O perfil de liberação *in vitro* destes sistemas mostraram que as emulsões contendo 1,0% e 0,5% de ETC podem ser liberadas de forma controlada durante um período de 16 e 23 horas, respectivamente. Os testes de estabilidade acelerados foram realizadas por 90 dias e os valores de pH, condutância, tamanho de micela, propriedades reológicas e teor total de polifenóis destes sistemas foram avaliados. Após o período de 90 dias, os resultados mostraram que a condição de armazenamento a -20 ± 2 °C a formulação sem ETC floculou, enquanto que a 40 ± 2 °C a 75 ± 5 % de umidade relativa acelerou o processo de degradação do teor total de polifenóis na EMCTC1 levando à separação de fases. Os outros parâmetros se mantiveram estáveis.

Palavras Chave: Emulsão múltipla; Nanoemulsão; Liberação de fármaco; Catuaba; *Trichilia catigua*.

Abstract

Multiple Emulsions (ME) containing standardized *Trichilia catigua* extract (TCE) were prepared by phase inversion emulsification method. The system consisted of the aqueous phase, oily phase (emollients and two surfactants) and TCE. Three emollients (“andiroba”, “buriti” and “canola” oil) and concentrations of TCE, 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w), were evaluated used as well. ME were characterized in relationship to macroscopic and microscopic aspect. After the characterization tests in the formulations prepared from canola oil with and without TCE were selected. Canola droplets with regular morphology, mean diameter ranging of 277.22 nm (without TCE), 306.85 nm with 0.5%, w/w and 323.48 nm with 1.0% w/w, and good trapping efficiency for TCE were obtained. The formulations were also submitted to rheometry (flow) and *in vitro* evaluation of the release profile. The formulations showed Non-Newtonian flow and pseudoplastic behavior with minimal thixotropy. The *in vitro* release profile of these systems showed that the emulsions containing 1.0% and 0.5% of TCE can be released in a controlled manner for a period of 16 and 23 hours, respectively. Accelerated stability tests were performed by 90 days and the pH, conductance, droplet size, rheological properties and polyphenol total content of these systems were evaluated. After 90 days, the results showed that the storage condition at -20 ± 2

°C the formulation without ETC flocculated, at 40 ± 2 °C at $75 \pm 5\%$ relative humidity has accelerated the degradation process of the total polyphenol content in the MECTC1 resulting in phase separation. The other parameters remained stable.

Keywords: Multiple emulsion; Nanoemulsion; Drug delivery; Characterization; stability; *Trichilia catigua*

4.1 Introduction

Multiple emulsions, also called double emulsions, are multicompartmental systems obtained by preparation of a primary emulsion which is re-emulsified, having either a water-in-oil-in-water (W/O/W) or an oil-in-water-in-oil (O/W/O) structure, whereby the dispersed droplets contain smaller droplets of a different phase (Aserin, 2008). Many applications using multiple emulsions (ME) in various fields have been reported, like as in pharmaceutical, cosmetic (Okochi et al., 2000; Ma et al., 2006; Morais et al., 2006; Hemar et al., 2010), and food applications (Bonnet et al., 2009). The multiple emulsion W/O/W may be used as a means for release controlled active hydrophilic substances. The largest area of application in the pharmaceutical industry for use of the W/O/W emulsion is for the controlled release of vaccines, vitamins, enzymes, hormones. Another advantage of this system is increased stability of drugs unstable in solution or in the environment, such as vitamin C (Farahmand et al., 2006).

ME can be prepared using many methods, however two of them are more used because of the simplicity of the operational procedures involved: one-step emulsification or in two steps. In this way, several authors have reported the advantages and disadvantages of these methods of preparation of the ME (Aserin, 2008; Morais et al. 2006).

Moreover, according to Hemar et al. (2010), the encapsulation of natural products is important for the maintenance of biological activity, since they normally have great instability in the face of environmental change.

To the best of our knowledge, there are few reports in the literature that address the development of multiple emulsion systems as a way to improve the stability of natural products (Cho; Park 2003, Hemar et al. 2010).

In addition there is a great demand on the addition of natural antioxidants in cosmetic and pharmaceutical dosage forms for topical application, and tannins (polyphenol) can exert this activity (Rolim et al., 2005, 2006; Scotti et al., 2007). *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae), a popular medicinal native plant that grows abundantly in several regions of Brazil, popularly knowed as “Catuaba” or “Catiguá”. The crude extract and isolated compounds (epicatechin,

cinchonains Ia, Ib, IIa, IIb, catiguanins A and B, apocynin E, and procyanidins B2 and C1) from the barks of *T. catigua* have demonstrated antioxidant activity towards free radical 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and the reduction of the Fe³⁺/ferricyanide complex to the ferrous form (De Bruyne et al., 1999; Brighente et al. 2007; Tang et al., 2007; Resende et al., 2011).

Thus, the aim of this study was to develop and characterize W/O/W multiple emulsion containing vegetable oil as platform to delivery standardized extract of *T. catigua* (TCE), and evaluate the accelerated stability of the ME containing the TCE.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Materials

Barks of *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae) were collected in São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brazil (March/2008), and a voucher specimen was identified by Dr. Gerdt Guenther Hatschback and deposited at the Herbarium of Curitiba Town Hall under number 306253, Curitiba, PR, Brazil. The samples were obtained by Laboratory Catarinense S/A (Lot #21828; Joinville, SC, Brazil). The vegetable oils were as pharmaceutical grade, andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl., Mapric®, Brazil), buriti oil (*Mauritia flexuosa* L. f., Mapric®, Brazil) and canola oil (*Brassica napus* L., Cocamar®, Brazil). The reagents and solvents were of analytical grade: 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma, USA), Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, USA), vitamin C (ascorbic acid, Delaware, Brazil), propylene glycol (Synth®, Brazil), PEG 40 hydrogenated castor oil (BASF®, Germany), Sorbitan monooleate (Oxiteno®, Brazil), Folin-Ciocalteu reagent 2N (Dinâmica, Brazil), sodium carbonate solution and standard pyrogallol (Sigma, USA).

4.2.2 Preparation and characterization of the standardized *T. catigua* extract (TCE)

The standardized extract was prepared with air-dried stem barks of *T. catigua* (10%; w/w), using ethanol/methanol/acetone/water (25:25:25:25; v/v), by turbo-extraction (Ultraturrax® IKA, model UTC115KT, USA) for 15 min at t<40 °C. After, the extract was filtered, concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and freeze-dried, to obtain the standardized extract of *Trichilia catigua* (TCE) (Lonni et al., 2012).

The total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity were determined according Lonni et al. (2012). Briefly, stock solutions were prepared of TCE (0.15 g) mixed with 250 ml of water, and pyrogallol solution (50 mg/100mL). The absorbance of the resulting solution

was read spectrophotometrically (Shimadzu UV/VIS PC-1650, Japan) at 760 nm. The results are reported as the mean±standard deviation of total polyphenols. The free radical scavenging activities of extracts of *T. catigua* were measured by using the DPPH method according Amarowicz et al. (2004). Solutions of TCE, Trolox® and vitamin C at different concentrations (1–10 µg/mL) were dissolved in 3 mL of methanol and then added to a methanolic solution of free radical DPPH (1 mmol/L, 375 µL). The absorbance of the resulting solution was read spectrophotometrically (Ocean Optics UV/VIS CHEM2000, EUA) at 516.99 nm. The results are reported as the mean±standard deviation of 50% inhibition (IC50). All tests were carried out in triplicate.

4.2.3 Multiple emulsion preparation

W/O/W emulsions, with and without TCE, were prepared by the phase inversion emulsification method in one step, using three different vegetable oils, two non-ionic surfactants, propylene glycol, and distilled water. The emollients were: andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.), buriti oil (*Mauritia flexuosa* L. f.), and canola oil (*Brassica napus* L.) according to a HLB number of each oil (7.00, 7.25, and 8.80, respectively). The emulsifiers were non-ionic surfactants lipophilic: PEG 40 hydrogenated castor oil with HLB number 4.3 and hydrophilic: Sorbitan monooleate with HLB number 14.1.

Nine formulations were prepared by the phase inversion temperature method (PIT) by one-step (Morais et al., 2006) and two concentrations, 0.5% and 1.0% (w/w) of TCE, according Table 4.1. The PEG 40 hydrogenated castor oil (2.58%; w/w) and sorbitan monooleate (2.42%; w/w) were dispersed in the oil phases. Oil and aqueous phase were separately heated to 78 ± 2 °C. Water phase was slowly added into oil phase with stirring at 450 rpm (Mixer RW20 Digital IKA, USA) until the temperature decreased to 40 °C. Moreover, TCE (0.5% or 1.0%) was homogenized with propylene glycol until complete dispersion for about 30 min. After, this mixture was slowly added into ME and stirred at 450 rpm, until the temperature decreased at 25 °C.

4.2.4 Characterization of the multiple emulsions

4.2.4.1 Morphological aspect

Each sample was evaluated to detect visible modifications or instabilities such as macroscopic aspect, creaming and coalescence in two moments, after 24 h and after centrifugation test. Five grams of sample were centrifuged at three different rotations (1200, 2400, and 3600 rpm) for 15 min at room temperature (Centrifuge 206 Baby I Fanem BE). Three measurements were performed for each ME (ICH, 2003; Isaac et al., 2008).

Table 4.1 - Composition of nine formulations different multiple emulsions (W/O/W) respectively of the andiroba, buriti, and canola oil: without TCE (MEA, MEB and MEC), with 0.5 % TCE (MEATC05, MEBTC05 and MECTC05), and with 1.0% TCE (MEATC1, MEBTC1 and MECTC1), and the required HLB number of each formulation.

Composition	MEA % (w/w)	MEB % (w/w)	MEC % (w/w)	MEATC 05 % (w/w)	MEBTC 05 % (w/w)	MECTC 05 % (w/w)	MEATC 1 % (w/w)	MEBTC 1 % (w/w)	MECTC 1 % (w/w)
Andiroba oil	5.00	-	-	5.00	-	-	5.00	-	-
Buriti oil	-	5.00	-	-	5.00	-	-	5.00	-
Canola oil	-	-	5.00	-	-	5.00	-	-	5.00
Sorbitan monooleate	2.42	2.42	2.42	2.42	2.42	2.42	2.42	2.42	2.42
PEG 40	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58
hydrogenated castor oil									
Distilled water	79.00	79.00	79.00	79.00	79.00	79.00	79.00	79.00	79.00
<i>T. catigua</i> extract (TCE)	-	-	-	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
Propylene glycol	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Required HLB number (emulsion)	7.9	8.0	8.8	7.9	8.0	8.8	7.9	8.0	8.8

4.2.4.2 pH and conductance measurements

The pH and conductance of each formulation was determined using a pHmeter (Gehaka, Brazil), calibrated with buffer solutions (pH 4.0 and 7.0). Three replicates of each formulation were tested (FARMACOPÉIA, 2010).

4.2.4.3 Droplet size analysis and distribution

The samples of ME were subjected to particle analysis by a CARL ZEISS DCM510 optical microscopy with Image Pro Plus 4 Analysis System. Droplets were placed on a glass slide, and the size measurements of them were performed using Feret's diameter as parameter

(BRUSCHI et al., 2003). One thousand and five hundred nanoparticles were measured and the particle size distribution was estimated.

4.2.5 Assay for TCE trapping efficiency

The amount of TCE in the ME was determined by the spectrophotometric method, determining TPC (Shimadzu UV/VIS PC-1650, Japan). An accurately weighed portion (0.3 g) of the ME was mixed in a tube shaker with 1.0 g of sodium chloride solution (20%) and extracted with 1.500 μ L of ethyl acetate in a microtiter shaker at 1.200 rpm (MS1 Minishaker, IKA, USA) by 3 min (n=4). Later, the tubes were placed in a refrigerated microcentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf), at 4,000 rpm, for the total separation of the phases, for 4 min at 5 °C. The ethyl-acetate phase was separated. After evaporation of solvents the residue was weighed (MER).

MER was dissolved in purified water and transferred to a volumetric flask (25.0 ml) completing to volume with purified water. An aliquot (5 mL) was filtered through HAWP 01300, 0.45 μ m Millipore filter. The percentage of total polyphenols in ME was evaluated using the Folin-Ciocalteu reagent and following a method from the European Pharmacopoeia (2007). Samples of 2 mL of the filtrate were employed. The results are reported as the mean \pm standard deviation of TPC. The test was carried out in triplicate.

The entrapment efficiency for TCE of the ME was concluding using the TPC results obtained from TCE with the ME.

4.2.6 Continuous flow rheometry

The rheological analysis of formulations, without and with (0.5 and 1.0%) TCE, was performed at 25 ± 2 °C in a Rheometer Haake Mars II controlled shear rate rotating viscometer (Thermo Electron Corporation, Germany), equipped with cone and plate unit (C60/1 °, 60 mm diameter). Samples (1.5 mL) were carefully applied to the cone, ensuring that formulation shearing was minimized, and allowed to equilibrate for at least 5 min prior to analysis. In continuous shear analysis (viscosity), upward and downward flow curves for each formulation were recorded over shear rates ranging from 10 to 200 rpm. Shear rate from 10 to 200 s^{-1} for 150 s, held at the upper limit for 10 s, and then decreased over a period of 150 s. In each case, the continuous shear properties of at least three replicates were determined and the upward flow curves were modelled using the Oswald-of-Waele equation (power law; Eq. (1)) (Jones et al., 2009; Bruschi et al., 2010).

$$\sigma = k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

were σ is the shear stress (Pa), k is the consistency index ((Pas)ⁿ), $\dot{\gamma}$ is the rate of shear (s⁻¹), and n is the flow behaviour index (dimensionless).

4.2.7 *In Vitro Release of TCE from Multiple Emulsion*

In vitro release of TCE from ME was determined using a diffusion cell (Franz diffusion cells modified) using cellulose acetate membrane (Avg. flat width 76 mm Sigma - Aldrich) to control the release. The release medium was purified water at 37 ± 1 °C, under constant stirring. An aliquot of 3 mL (v/v) of the formulation was placed into flow cells and at predetermined time intervals (30, 60, 120, 180, 240, 360, and 480 min) an aliquot 2 mL (v/v) of the samples of the dissolution fluid were collected. The same quantity of purified water was replaced to maintain the volume into flow cells. All tests were carried out with three replications, as previously described by Bruschi et al. (2003). The phenolic compounds released from the formulation at each time interval were quantified relative to TPC, according 2.5.

To investigate the mechanism of drug release, the data generated from these release studies were fitted to the general release equation (Equation 1) using logarithmic transformations and least squares regression analysis. The results refer to the average of three experiments.

$$Kt^n = \frac{M_t}{M_\infty} \quad (1)$$

where M_t is the amount of drug released at time t , M_∞ is the total drug content; k is a constant incorporating structural and geometric characteristics of the device, and n is the release exponent which may indicate the mechanism of drug release.

4.2.8 *Stability Study of ME containing TCE*

Accelerated stability study was performed according to ICH (2003). The samples were packaged in amber glass hermetically and exposed to a range of different storage conditions: 25 ± 2 ; 5 ± 2 ; -20 ± 2 ; 40 ± 2 °C at $75 \pm 5\%$ relative humidity and exposure the sun. Before initiating the stability studies each emulsion was submitted to three different rotations (1200, 2400, and 3600 rpm) during 15 min for each cycle. After, physical and chemical attributes were studied: pH, conductivity (c), droplet size (size) and total polyphenol content in ME.

Evaluation of samples was carried out at 1, 30, 60, and 90 days after exposure to the conditions described above. Tests were carried out in triplicate.

The ME, without and with TCE, was evaluated to the organoleptic parameters: appearance, color, and odor for all storage conditions (ICH, 2003). The color analysis of ME, without and with TCE, was performed using spectrophotometric method according Isaac et al. (2008). The ME were diluted in distilled water, 1:250 and 1:500 (v/v), respectively. This mixture was evaluated using the spectrophotometric analysis of scanning (400-700 nm) in comparison with the scan pattern (sample also diluted at time zero). The hyperchromic and hypochromic, relating to the intensity of the band, and bathchromic or hypsochromic effects of the variation in wavelength relative to the maximum absorption, are indicative of a change in intensity of color or change in color and thus may indicate instability. The sample can be classified by their color as normal, without alteration, slightly modified, modified, heavily modified. The odor of the sample was compared with the standard smell, directly through the nose. The sample can be classified by as normal, without alteration, slightly modified, changed, modified intensely (Isaac et al., 2008).

4.2.9 Statistical Analysis

Features of the ME such as droplet size, pH, conductance, TPC, consistency index and the flow index (both derived from the Power Law model) and the stability study were statistically evaluated using analysis of variance (ANOVA). Individual differences between means were identified using Tukey's test. In all cases, a significance level of $p < 0.05$ was accepted to denote significance.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Characterisation of the TCE

The quaternary mixtures with equal proportions of water, methanol, acetone, and ethanol from TCE barks resulted in TPC of $50.84\% \pm 0.57$, and antioxidant capacity 4.59 ± 0.01 , according Lonni et al. (2012).

4.3.2 Multiple emulsion preparation

ME can be obtained by inversion phase process and one step method for production W/O/W multiple emulsions, without and with TCE, in two concentrations, 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w). The pair of surfactants, sorbitan monooleate (4.3) and PEG 40 hydrogenated

castor oil (13.0) resulted stable emulsions, which remained stable without modifications for 24 h.

Many cosmetics products incorporating vegetable oils to prepare emulsions, due to the presumable safe utilization, ecological orientation and preservation, reduced ambient impact (Paniwnyk et al., 2001). Furthermore because of their properties to form stable emulsion despite HLB number, biological activity, scattering and improves the sensory perception, low potential comedogenic, and promote smoothness and moisture (Rolim et al., 2006). In this study, was chosed in “andiroba” (Ferreira et al., 2010), “buriti” (Zanatta et al., 2008), and “canola” (Morais et al., 2006), which was previously characterized by their properties to form stable emulsion, contains fatty acids and show several pharmaceutical and cosmetic properties and applications.

Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae), is a Brazilian popular medicinal plant (Sampaio, 2000), has been used in traditional. The oil from seed *C. guianensis* has been widely used for pharmaceutical and cosmetic applications (Ferrari et al., 2007; Ferreira et al., 2010). Among its properties shows anti-inflammatory activity (Penido et al., 2006a), insect repellent (Miot et al., 2004), anti-allergic and analgesic (Penido et al. 2006b), and emollient activities (Franquilino et al., 2006).

Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) is an Amazonian fruit rich in micro nutrients, with antioxidants and photoprotector properties. During the development of new cosmetic formulations, the skin irritation potential must be investigated in order to identify chemicals which might induce adverse skin reactions, previously to human exposition to such substances (Zanatta et al., 2008).

Canola oil is obtained by mechanical expression or n-hexane extraction from the seeds of *Brassica napus* (*Brassica campestris*) var. *oleifera* DC., and certain other species of *Brassica* L. (Cruciferae). The crude oil is refined, bleached, and deodorized to substantially remove free fatty acids, phospholipids, color, odor, and flavor components, and miscellaneous non oil materials. In pharmaceutical and cosmetic formulations, canola oil is used mainly in topical preparations such as soft soaps and liniments (Rowe et al., 2006; Morais et al., 2006).

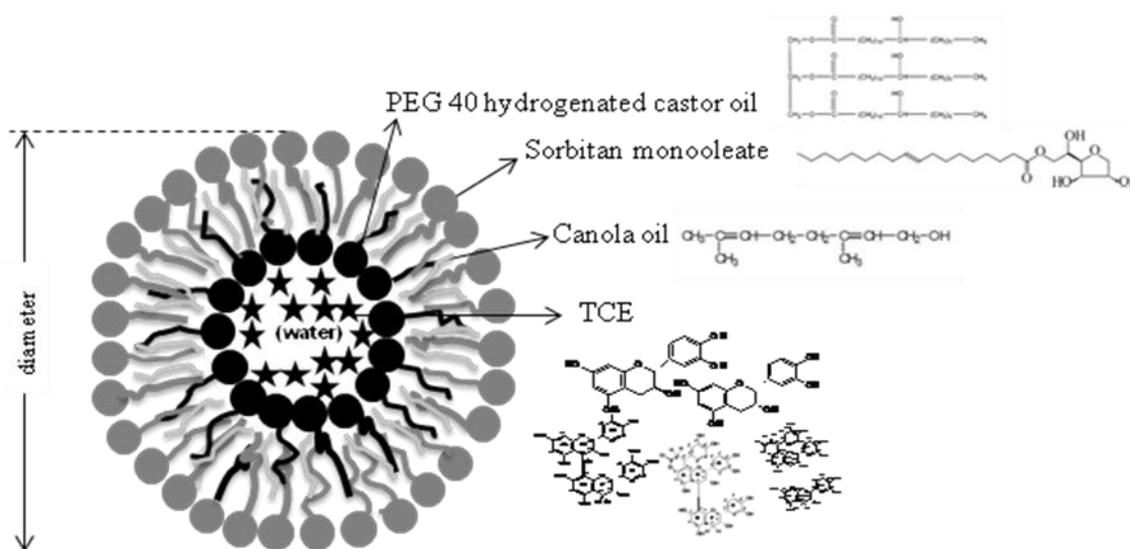
The composition of the multiple emulsion is important to keep the system stability due the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) (Morais et al., 2006; Aserin, 2008; Hemar et al., 2010).

In Table 1 the composition of nine different formulations of ME, respectively, with “andiroba”, “buriti” and “canola” oil (MEA, MEB, and MEC) can be observed, ME containing 0.5% of TCE: MEATC05, MEBTC05, and MECTC05, and with 1.0% of TCE:

MEATC1, MEBTC1, and MECTC1. Figure 1 shows schematic representation of W/O/W multiple emulsion with TCE, containing the PEG 40 hydrogenated castor oil (high HLB surfactant), sorbitan monooleate (low HLB surfactant), canola oil (medium HLB emollient), and TCE (hydrophilic drug) with their chemical structures.

The formulations presented required HLB values of 7.9, 8.0, and 8.8, respectively. According to Bancroft's rule (1913), stabilization of direct and inverse emulsions requires the use of a surfactant with high and low HLB, respectively. Such systems are characterized by the existence of two opposite interfaces, of different radii of curvature (Aserin, 2008). In this study, the formulations with higher HLB number value (Canola oil) showed the best performance and produced the more stable systems (Table 4.1) that suggest a positive influence of required HLB number the system. Furthermore, showed the lower droplets size (Fig. 4.1).

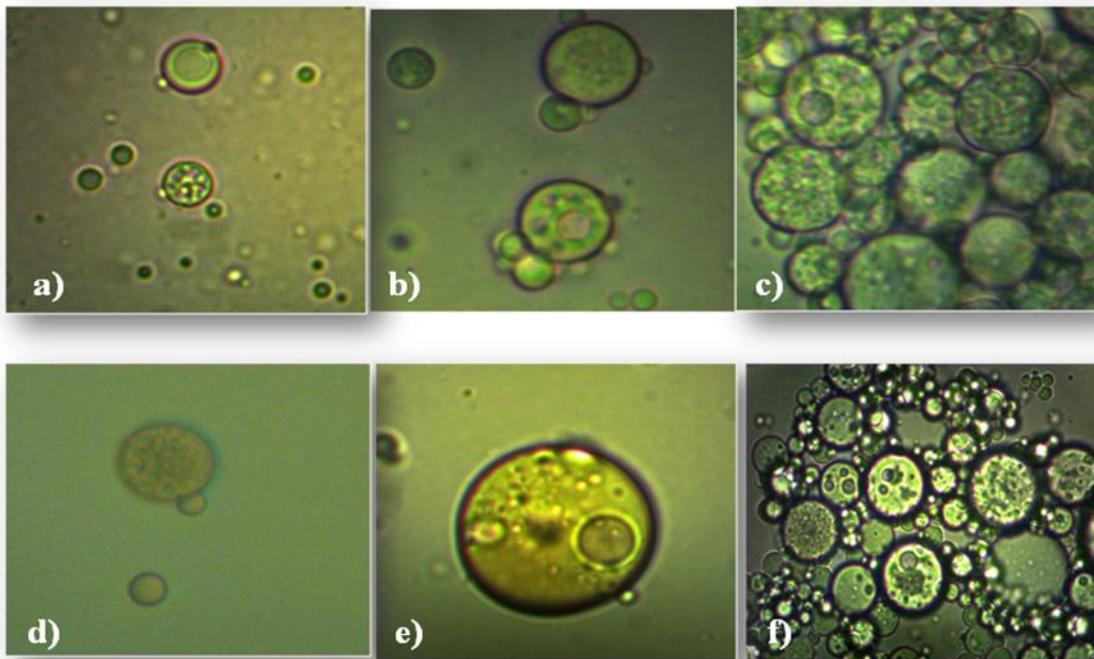
Figure 4.1 - Schematic representation of W/O/W multiple emulsion with TCE. Chemical structure of the PEG 40 hydrogenated castor oil, sorbitan monooleate, and canola oil.



The temperature of preparation (78 ± 2 °C) was key parameter for obtaining these systems in one step, which is in accordance with literature (Morais et al., 2006; Aserin, 2008). Samples handled at other temperatures showed deformed droplet morphology, suggesting that temperature is an important factor in the formation of multiple emulsion and its morphology. The high temperature improves Brownian motion, this process would allow the droplets to overcome the energy barrier and, thus, they could approach each other (Aserin, 2008).

According to Florence and Whitehill (1982) the emulsions can be classified according to their morphology: type A: multiple droplets that have a single large internal droplets; type B: droplets that have multiple small globules reasonable amount of internal, and type C: multiple droplets that have plenty of small internal droplets, the most being used as cosmetic and/or pharmaceutical vehicles. In this study the buriti samples were classified as type A, andiroba samples as type B, and canola as type C, independently of TCE addition, probably due to the oil type and therefore the HLB of each formulation.

Figure 4.2 - Photomicrographs of W/O/W multiple emulsion, with and without TCE. Droplets size showed: a) MEATC05 b) MEBTC05 c) MECTC05 and with 1.0% (w/w) TC: d) MEATC1, e) MEBTC1 and f) MECTC1. Original magnification 1000X.



4.3.3 Characterization of the multiple emulsions

Macroscopic aspect of the formulations were analyzed at room temperature (25 ± 2 °C) 24 h after the preparation. The MEA and MEC showed milky aspect, the MEB showed yellowish aspect, characteristic of this oil. The all emulsions showed characteristic color of *T. catigua* and milky aspect. No formulation showed creaming, coalescence, and phase separation.

After centrifugation test, at room temperature (25 ± 2 °C), only MEC, MECTC05 and MECTC1 did not show instability signs, regarded as stable and subjected to the stability tests.

The centrifugation produces stress in the sample, simulating an increase in the force of gravity and increasing the mobility of the particles thus anticipating possible instabilities. These changes may appear in the form of precipitation, phase separation or coalescence.

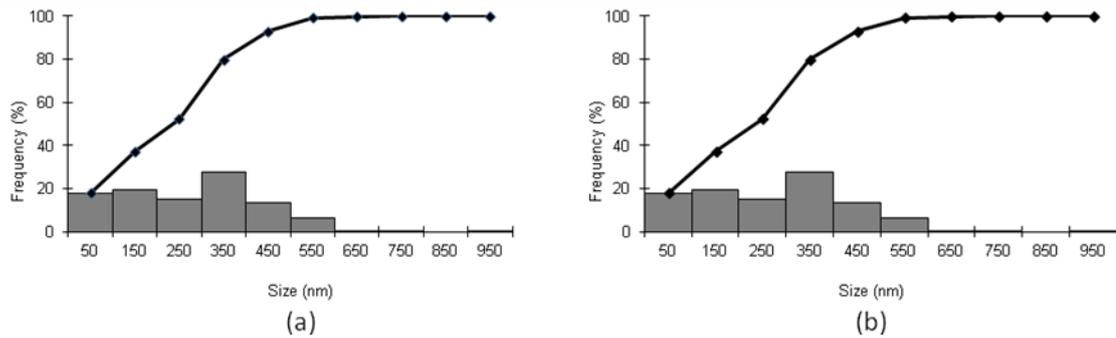
Determination and control of pH formulation, from the cosmetic and/or dermatological point of view, are important to the effectiveness of the formulation. The pH measured in all the formulations were between 4.6 to 5.8, the same values of the pH of the cutaneous surface. There isn't statistically significant difference in the pH in relation to the oil type and concentration of the extract (Anova).

Conductance measurements are commonly used to detect release of electrolytes from the globules internal phase. The highest conductance was observed in samples MEBTC1 (81.6 ± 0.12) > MEATC1 (78.0 ± 0.10) > MECTC1 (70.5 ± 0.06) > MEATC05 (69.0 ± 0.06) > MEBTC05 (68.9 ± 0.12) > MECTC05 (56.0 ± 0.06) > MEB (47.1 ± 0.10) > MEA (39.5 ± 0.15) > MEC (10.7 ± 0.10). This shows that the concentration of the extract influence on the conductance, as well as "buriti" oil. The variance analysis demonstrated that there statistics significant difference in the conductance ($p=5.13E^{-16}$) in relation to oil type and addition of the extract involved in this study.

Nanoemulsion was obtained by the method proposed in the all formulations. The droplets showed regular morphology and mean diameter (nm) of 422.13 ± 0.21 for MEA, 451.05 ± 0.30 for MEB, and 277.22 ± 0.16 . The droplets with TCE (0.5%) had a mean diameter (nm) of 425.27 ± 0.21 for MEATC05, 474.57 ± 0.34 for MEBTC05, 306.85 ± 0.17 for MECTC05. The droplets with TCE (1.0%) had a mean diameter (nm) of 443.17 ± 0.25 for MEATC1, 488.28 ± 0.36 for MEBTC1, and 323.48 ± 0.19 for MECTC1 (Fig. 2). These results of ME with "canola" oil are in agreement with Morais et al. (2006). The variance analysis demonstrated that there statistics significant difference in the droplets size ($p=1.12E^{-07}$) in relation to type of the oil involved in this study.

The all droplets were prepared by the phase inversion emulsification method by one step, using the conditions of experiments 2.3. The typical size distribution graphs are presented in Fig. 4.3. The canola's droplets added TCE, 0.5% (a) and 1.0% (b), respectively, showed heterogeneous size distribution and that most of the micelles are between 300 and 400 nm, thus 28.47% for MECTC05, and 26,77% for MECTC1, whereas the improved stability obtained with the ME canola oil.

Figure 4.3 – Size distribution of canola oil droplets with 0.5% (w/w) *T. catigua* extract (a) and 1.0% (w/w) *T. catigua* extract (b): size frequency distribution (bars) and size cumulative frequency distribution (line). The particle size class interval is 100 nm.



4.3.4 Assay for TCE trapping efficiency

To calculate the entrapment efficiency for TCE of the droplets, emulsions containing TCE were quantified by spectrophotometric method. The results were 91.66% and 75% of trapping efficiency for ME 0.5% (w/w) and ME 1.0% (w/w), respectively.

Thus, good entrapment efficiency for TCE was obtained. Moreover, the trapping efficiency for ME 0.5% showed be greatest, suggesting the MEC had the maximum capacity of TCE concentration. This can be confirmed analyzing the results of ME 1.0% (w/w), where it was added twice TCE concentration and the trapping efficiency was lower than ME 0.5% (w/w).

4.3.5 Continuous shear (flow) rheometry

The rheometry studies showed nonlinear response (Fig. 4 and 5). All the canola's formulations without and with TCE exhibited non-Newtonian flow and pseudoplastic (shear-thinning) behavior with low thixotropy (rheopexy). It was also observed that viscosity and thixotropy increased with increasing TCE concentration (Fig. 4.4). Therefore, probably TCE components interacted with the systems chains. The systems containing TCE exhibited low consistency, existing in liquid form, results that agree with the density values, which were very near the water. The statistical comparisons of the effects of concentration on the flow properties of the formulations, the up-curve of each rheogram was mathematically defined using the Oswald of Waele equation (1) according to Power law model and from which the consistency and flow index of each formulation were derived (Table 4.2). The ANOVA

analysis demonstrated that statistics significant difference in the consistency ($p=1.63E^{-07}$) and flow ($p=1.75E^{-06}$) in relation to addition of the TCE. The results of MECTC1 and MECTC05 showed low viscosity, thixotropy or reopexia minimum, and also equilibrium viscosity to ensure that there is adequate retention in the skin, thus these properties are fundamental to their use.

Table 4.2 – Power Law Parameters of Formulations with and without *T. catigua* extract (TCE) at 25 °C.

Formulations	Consistency Index (Pa.s) ^a	Behavior Flow Index (Dimensionless) ^a
MECTC	0.004 ± 0.000	0.819 ± 0.032
MECTC05	0.004 ± 0.000	0.666 ± 0.029
MECTC1	0.005 ± 0.000	0.670 ± 0.015

^aValues represent the mean (standard deviation) of five replicates.

Figure 4.4 - Flow rheograms of canola's formulations (a) without extract (b) with 0.5% TCE (w/w) and with 1.0% TCE (w/w) at 25°C. Red colors show the upcurve and blue colors the downcurve. Standard deviations have been omitted for clarity; however, in all cases the coefficient of variation of at least 3 replicate tests was less than 5%.

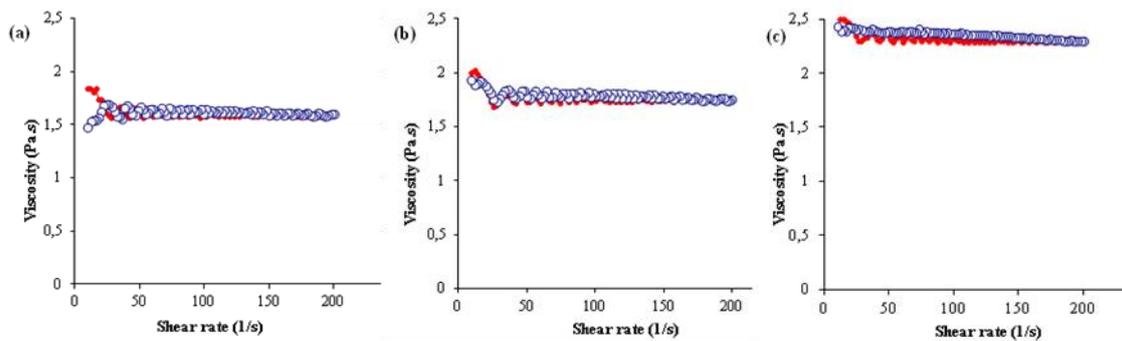
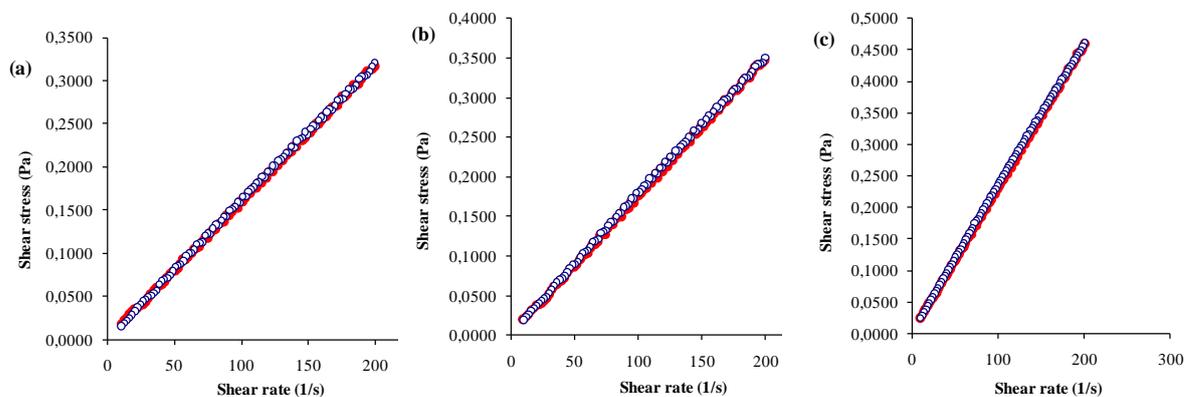


Figure 4.5 - Flow rheograms of formulation without (a) and with TCE: MECTC05 (b) and MECTC1 (c). Red colors represents upcurve and blue colors represents downcurve. Standard deviations have been omitted for clarity; however, in all cases, the coefficient of variation of replicate analyses was less than 7%.



4.3.6 *In Vitro* Release of TCE from Multiple Emulsion

The *in vitro* release profiles of MECTC05 and MECTC1 are reported in Table 3 and Figure 6. Under the test conditions, a first order release was evident for all the emulsions. The release rate of the MECTC05 and MECTC1 was proportional to their concentrations in the extract. The *in vitro* release profile of these systems showed that the emulsion contained in the TCE (1.0%) can be released in a controlled manner for a period of 16 h on the skin, while the ETC contained in the emulsion (0.5%) for a period of 23 h (Table 4.3). The results show first order kinetics.

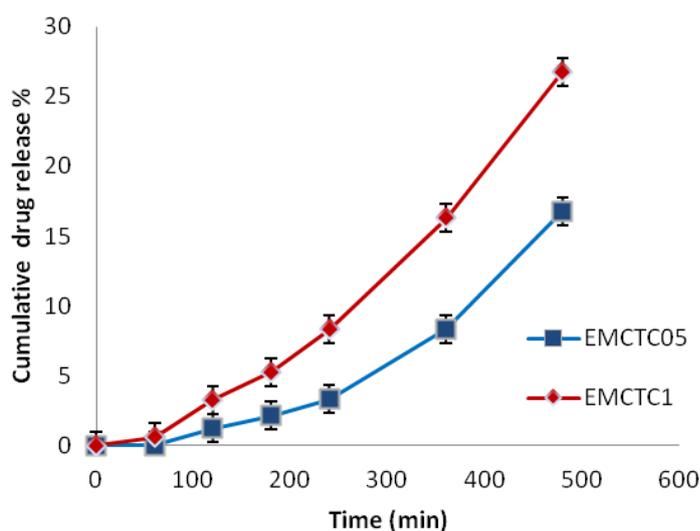
The release mechanism of TCE from the systems was investigated by means of Equation 1. The results were 1.85 ± 0.11 and 1.79 ± 0.09 for MECTC05 and MECTC1, respectively. As index $n > 1$, the release is governed by super case II transport. It is an evolution of the case II transport, where there is expansion of the forces exerted by the water entering in the external phase of the ME which presses the internal phase.

Table 4.3 – Time (hours) required for the release to 10, 30, 50, and 100% of the original mass of TCE from the formulations under examination.

Formulation	TCE Concentration (% w/w)	Time (hour)			
		$t_{10\%}^a$	$t_{30\%}^a$	$t_{50\%}^a$	$t_{100\%}^a$
MECTC05	0.5	6.5 ± 0.05	11.8 ± 0.48	15.6 ± 0.90	23.0 ± 1.82
MECTC1	1.0	4.4 ± 0.12	8.2 ± 0.12	10.9 ± 0.28	16.0 ± 0.72

^aValues represent the mean (±standard deviation) of at least triplicate determination.

Figure 4.6 – Release profile of canola oil multiple emulsion with *T. catigua* extract (TCE): ■ marker multiple emulsion with TCE 0.5% (w/w); ◆ marker multiple emulsion with TCE 1.0% (w/w).



4.3.7 Stability Study of TCE from Canola Multiple Emulsion

The aspect, color (results not showed), and odor for MEC and MECTC05 stored at room temperature (25 ± 2 °C) and 5.0 ± 2 °C did not suffer perceptible alterations during the study period of 90 days. MEC stored at -20 ± 2 °C presented in the 90 day depletion flocculation, but MECTC05 and MECTC1 did not suffer alterations. These results show that TCE maintain the stability of the formulation, probably by the extracts to be rich in polyphenolic compounds and their hydroxyl groups, capable of hydrogen bond interactions. According to Lopes et al. (2012) the bonding increases with the number of hydroxyl groups

present in the tannins nucleus. MECTC05 and MECTC1 stored at 40 ± 2 °C at $75 \pm 5\%$ relative humidity, showed alteration of the color and decrease of TPC at the end of the experiment, being considered unstable to the high temperature (40 ± 2 °C) in relation of the color and total polyphenol content.

The TPC remained constant after 90 days of storage, in both the MECTC05 and MECTC1 formulations, after exposure to the conditions at 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, and -20 ± 2 °C. Variance analysis test showed no significant differences ($p > 0.05$).

In the samples submitted to all conditions above were observed an increase the droplet sizes by 90 days. The increase in the concentration of MECTC1 may result from an interaction by hydrogen bonding between oligomers and/or polymers of the condensed tannins (Lopes et al., 2012).

The variance analysis demonstrated that there is statistically significant difference in the pH ($p=1.17E^{-8}$) and conductance ($p=5.13E^{-16}$) in relation to addition of the extract involved in this study ($p < 0.05$).

Table 4.4 - Results for pH, conductivity (c) and droplet size (size) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C, 40 ± 2 °C with $75\% \pm 5\%$ UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil and without TCE.

MEC	Time (days)			
	1	30	60	90
Temp. 25 ± 2 °C				
• pH	6.36 ± 0.05	6.34 ± 0.01	6.35 ± 0.02	6.37 ± 0.02
• c (mV)	10.70 ± 0.06	11.00 ± 0.03	10.60 ± 0.01	10.73 ± 0.25
• Size (nm)	277.22 ± 0.16	279.02 ± 0.10	282.78 ± 0.02	283.23 ± 0.02
Temp. 5 ± 2 °C				
• pH	6.36 ± 0.05	6.34 ± 0.01	6.33 ± 0.02	6.37 ± 0.02
• c (mV)	10.70 ± 0.06	11.00 ± 0.03	10.60 ± 0.01	10.80 ± 0.10
• Size (nm)	277.22 ± 0.16	279.12 ± 0.30	281.20 ± 0.04	281.60 ± 0.04
Temp. -20 ± 2 °C				
• pH	6.36 ± 0.05	6.35 ± 0.01	6.38 ± 0.10	6.38 ± 0.03
• c (mV)	10.70 ± 0.06	10.60 ± 0.30	10.55 ± 0.10	10.88 ± 0.17
• Size (nm)	277.22 ± 0.16	277.98 ± 0.01	281.90 ± 0.02	290.12 ± 0.25
Temp. 40 ± 2 °C $75\% \pm 5\%$ UR				
• pH	6.36 ± 0.05	6.44 ± 0.01	6.45 ± 0.02	6.38 ± 0.03
• c (mV)	10.70 ± 0.06	10.40 ± 0.20	10.20 ± 0.07	10.88 ± 0.17
• Size (nm)	277.22 ± 0.16	298.18 ± 0.01	308.78 ± 0.02	312.23 ± 0.22
Light exposure				
• pH	6.36 ± 0.05	6.40 ± 0.02	6.42 ± 0.02	6.38 ± 0.03
• c (mV)	10.70 ± 0.06	10.80 ± 0.20	10.80 ± 0.10	10.83 ± 0.12
• Size (nm)	277.22 ± 0.16	278.10 ± 0.01	279.31 ± 0.20	280.12 ± 0.05

Mean of 3-fold-replicates

Table 4.5 - Results of pH, conductivity (c), droplet size (size) and polyphenol content (TPC) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C and 40 ± 2 °C with $75\% \pm 5\%$ UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil added 0.5% TC (MECTC05).

MECTC05	Time (days)			
	1	30	60	90
Temp. 25 ± 2 °C				
• pH	6.30 ± 0.05	6.28 ± 0.10	6.27 ± 0.20	6.30 ± 0.02
• C (mV)	56.00 ± 0.10	55.73 ± 0.15	54.27 ± 0.11	48.53 ± 0.46
• Size (nm)	306.85 ± 0.17	307.47 ± 0.01	309.30 ± 0.01	310.52 ± 0.21
• TPC (%)	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Temp. 5 ± 2 °C				
• pH	6.30 ± 0.05	6.29 ± 0.10	6.28 ± 0.20	6.30 ± 0.02
• C (mV)	56.00 ± 0.10	53.00 ± 0.30	51.00 ± 0.40	50.20 ± 0.17
• Size (nm)	306.85 ± 0.17	309.47 ± 0.01	310.84 ± 0.20	311.58 ± 0.30
• TPC (%)	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Temp. -20 ± 2 °C				
• pH	6.30 ± 0.05	6.31 ± 0.10	6.30 ± 0.01	6.31 ± 0.02
• C (mV)	56.00 ± 0.10	54.00 ± 0.05	55.30 ± 0.47	57.90 ± 0.26
• Size (nm)	306.85 ± 0.17	308.47 ± 0.01	311.97 ± 0.01	312.45 ± 0.98
• TPC (%)	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.20 ± 0.01
Temp. 40 ± 2 °C $75\% \pm 5\%$ UR				
• pH	6.30 ± 0.05	6.32 ± 0.05	6.31 ± 0.05	6.31 ± 0.02
• C (mV)	56.00 ± 0.10	51.00 ± 0.30	49.80 ± 0.80	57.90 ± 0.26
• Size (nm)	306.85 ± 0.17	309.33 ± 0.10	310.25 ± 0.50	311.32 ± 0.20
• TPC (%)	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Light exposure				
• pH	6.30 ± 0.05	6.29 ± 0.10	6.30 ± 0.01	6.31 ± 0.01
• C (mV)	56.00 ± 0.10	55.90 ± 0.30	55.53 ± 0.47	56.77 ± 0.80
• Size (nm)	306.85 ± 0.17	307.11 ± 0.05	309.01 ± 0.10	310.34 ± 0.20
• TPC (%)	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01

Mean of 3-fold-replicates

Table 4.6 - Results of pH, conductivity (c), droplet size (size) and polyphenol content (TPC) after accelerated stability test at conditions: 25 ± 2 °C, 5 ± 2 °C, -20 ± 2 °C and 40 ± 2 °C 75% \pm 5% UR with 75% \pm 5% UR and of the light exposure for multiple emulsion with canola oil added 1.0% TC (MECTC1).

MECTC1	Time			
	1d	30d	60d	90d
Temp. 25 ± 2 °C				
• pH	5.71 ± 0.02	5.75 ± 0.05	5.77 ± 0.10	5.78 ± 0.03
• C (mV)	70.40 ± 0.10	70.20 ± 0.05	69.80 ± 0.20	69.77 ± 0.49
• Size (nm)	323.48 ± 0.19	325.38 ± 0.01	327.42 ± 0.01	329.98 ± 0.20
• TPC (%)	0.36 ± 0.10	0.34 ± 0.10	0.38 ± 0.10	0.39 ± 0.10
Temp. 5 ± 2 °C				
• pH	5.71 ± 0.02	5.70 ± 0.02	5.73 ± 0.40	5.75 ± 0.02
• C (mV)	70.40 ± 0.10	69.30 ± 0.70	69.00 ± 0.50	69.97 ± 0.25
• Size (nm)	323.48 ± 0.19	324.12 ± 0.20	328.32 ± 0.80	330.22 ± 0.60
• TPC (%)	0.36 ± 0.10	0.40 ± 0.10	0.41 ± 0.00	0.37 ± 0.10
Temp. -20 ± 2 °C				
• pH	5.71 ± 0.02	5.98 ± 0.30	5.72 ± 0.02	5.75 ± 0.02
• C (mV)	70.40 ± 0.10	71.70 ± 0.10	70.13 ± 0.15	69.97 ± 0.25
• Size (nm)	323.48 ± 0.19	327.55 ± 0.01	331.99 ± 0.90	340.54 ± 1.00
• TPC (%)	0.36 ± 0.10	0.36 ± 0.00	0.40 ± 0.10	0.40 ± 0.10
Temp. 40 ± 2 °C 75% \pm 5% UR				
• pH	5.71 ± 0.02	5.74 ± 0.50	5.89 ± 0.10	5.95 ± 0.02
• C (mV)	70.40 ± 0.10	69.70 ± 0.30	68.80 ± 0.20	67.97 ± 0.25
• Size (nm)	323.48 ± 0.19	326.33 ± 0.10	330.54 ± 0.70	340.54 ± 1.00
• TPC (%)	0.36 ± 0.10	0.34 ± 0.10	0.32 ± 0.10	0.26 ± 0.10
Light exposure				
• pH	5.71 ± 0.02	5.76 ± 0.01	5.78 ± 0.01	5.77 ± 0.02
• C (mV)	70.40 ± 0.10	70.67 ± 0.15	70.77 ± 0.15	69.83 ± 0.38
• Size (nm)	323.48 ± 0.19	324.55 ± 0.20	325.13 ± 0.10	326.24 ± 0.10
• TPC (%)	0.36 ± 0.10	0.37 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01

Mean of 3-fold-replicates

4.4. Conclusions

The multiple emulsion W/O/W containing standardized *T. catigua* extract by one step was developed and characterized. Nanoemulsions were obtained by the process of emulsification by phase inversion. The temperature of manipulation and emulsification (78 ± 2 °C) were key parameters for obtaining these systems.

The emulsion obtained with “andiroba” and “buriti” oil can be considered unstable in the face of assessment methodologies and analysis used.

The formulations containing “canola” oil, without and with TCE, showed rheological profile of Non-Newtonian pseudoplastic.

The *in vitro* release profile of these systems showed that the emulsions at 1.0% and 0.5% can be released in a controlled manner for a period of 16 and 23 hours, respectively

The *in vitro* release profile of these systems showed that the emulsion contained in the ETC at 1.0% and 0.5% can be released in a controlled manner for a period of 16 h and 23 h, respectively.

The encapsulation efficiency *in vitro* release studies were considered efficient, according microscopic analyze.

Accelerated stability by 90 days demonstrated the pH, conductance, droplet size, rheological properties and total polyphenol content of these systems that the ME made with canola oil and without and with TCE (0.5% and 1.0%) had good stability.

The storage condition at 40 ± 2 °C at $75\pm 5\%$ relative humidity has accelerated the degradation process of the total polyphenol content. So, the ME containing TCE must not be stored at elevated temperatures.

Thus this study shows that multiple emulsion to be as plat form to delivery a standardized *Trichilia catigua* (Catuaba) extract.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

This work was support by the Brazilian granting agencies CNPq, CAPES/Proap, INCT_if, FINEP, COMCAP/UEM, and Fundação Araucária. The authors are grateful to Basf[®] and Oxiteno[®] by donation PEG 40 hydrogenated castor oil and Sorbitan monooleate respectively. We wish to thank Dra. Andréa Diniz for helpful discussions.

References

- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84, 551–562.
- Aserin, A., 2008. *Multiple emulsions: technology and applications*, first ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Baby, A.R., Migliato, K. F., Maciel, C. P. M., Zague, V., Pinto, C. A. S. O., Salgado, H. R. N., Kaneko, T. M., Velasco, M. V. R., 2007. Accelerated chemical stability data of O/W fluid

emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Braz. J. Pharm. Sci.* 43, 405-412.

Bancroft, W. D., 1913. Theory of emulsification. *J. Phys. Chem. A* 17, 501-519.

Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M.H., Anton, M., Leal-Calderon, F. 2009. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocoll.* 23, 92-101.

Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharm. biology* 45, 2, 156-161.

Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B., Gremião, M.P.D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int. J. Pharm.* 264, 45-55.

Bruschi, M.L. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. 2006. 318f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências de Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Bruschi, M.L., Franco, S.L., Gremião, M.P.D., 2010. Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26, 2381-2391.

De Bruyne, T.; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A., 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. System. and Ecology* 27, 445-459.

European Pharmacopoeia, 2007. Determination of Tannins in Herbal Drugs, sixth ed., European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg.

Farahmand, S., Tajerzadeh, H., Farboud, E.S., 2006. Formulation and evaluation of a vitamin C multiple emulsion. *Pharm. Dev. Technol.* 11, 255-261.

Farmacopeia Brasileira. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

Ferrari, M., Oliveira, M.S.C., Nakano, A.K., Rocha-Filho, P.A., 2007. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Braz. J. Pharm.* 17, 4, 626-630.

Ferreira, M.R.A., Santiago, R.R., Souza, T.P., Egito, E.S.T., Oliveira, E.E., Soares, L.A.L., 2010. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. *AAPS PharmSciTech.* 11, 3, 1383-1390.

Florence A.T., Whitehill, D., 1985. Stability and stabilization of water-in-oil-in-water multiple emulsions. *ACS Symp Ser (Macro and Microemulsions)*, 272, 359-380.

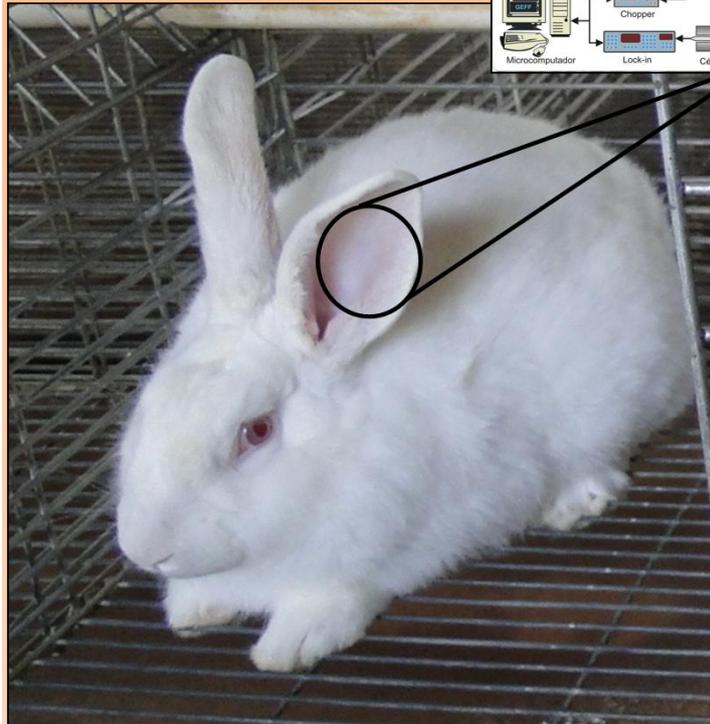
Franquilino, E., 2006. Ativos Amazônicos. *Cosmetics Toiletries (ed. Port.)* 18, 18-53.

Hemar, Y., Cheng, L.J., Oliver, C.M., Sanguansri, L., Augustin, M., 2010. Encapsulation of Resveratrol Using Water-in-Oil-in-Water Double Emulsions. *Food Biophysics* 5, 120-127.

ICH 2003. Guidelines on Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1(R2), Committee for proprietary medicinal products, London.

- Isaac, V.L.B., Cefali L.C., Chiari, B.G., Oliveira, C.C.L.G., Salgado H.R.N., Corrêa, M.A., 2008. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 29, 1, 81-96.
- Jones, D.S., Bruschi, M.L., Freitas, O. Gremião, M.P.D., Larab, E.H.G., Andrews, G.P., 2009. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int. J. Pharm.* 372, 49–58.
- Lonni, A.A.S.G., Longhini, R., Lopes, G.C., Mello, J.C.P., 2012. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal. Chim. Acta* 719, 57-60.
- Lopes, G.C., Longhini, R., Santos, P.V.P., Araujo, A.A.S., Bruschi, M.L., Mello, J.C.P., 2012. Preliminary assessment of the chemical stability of dried extracts from *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). *Int. J. Anal Chem* 2012, 1-7.
- Ma, E.L., Ha, H., Liu, Z., Zheng, C.X., Duan, M.X., 2006. In vitro and in vivo evaluation of a novel oral insulin formulation. *Acta Pharm. Sin.* 27, 1382–1388.
- Miot, H.A., Batistella, R.F., Batista, K.A., Volpato, D.E.C., Augusto, L.S.T., Madeira, N.G., Haddad-Júnior, V., Miot, L.D.B., 2004. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 46, 253-256.
- Morais, J.M., Santos, O.D.H., Delicato, T., Gonçalves, R.A., Rocha-Filho, P.A., 2006. *J. Dispersion Sc. Technol.*, 109-115.
- Okochi, H., Nakano, M., 2010. Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45, 5-26.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J., 2001. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrason. Sonochem.* 8, 299–301.
- Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S.S., Rodrigues, C.A.B., Pereira, J.F.G., Henriques, M.G.M.O., 2006a. Antiinflammatory effects of natural tetranortrit Penido erpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.* 55, 457-464.
- Penido, C., Costa, K.A., Pennaforte, R.J., Costa, M.F.S., Pereira, J.F.G., Siani, A.C., Henriques, M.G.M.O., 2006b. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res.* 54, 295-303.
- Resende, F. O., Rodrigues-Filho, E., Luftmann, H., Petereit, F., Mello, J.C.P., 2011. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *J. of the Brazilian Chem. Society (Impresso)* 22, 2087-2093.
- Rolim, A., Maciel, C. P. M., Kaneko, T. M., Consiglieri, V. O., Velasco, M. V. R., 2005. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *J. of AOAC International* 88, 1015-1019.

- Rolim, A., Oishi, T., Maciel, C. P. M., Zague, V., Pinto, C. A. S. O., Kaneko, T. M., Consiglieri, V. O., Velasco, M. V. R., 2006. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. *International Journal of Pharmaceutics* 308, 107-114.
- Rowe, C.R., Sheskey, P.J., Owen, S.C., 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, fifth ed. Pharmaceutical Press., Great Britain.
- Scotti, L., Scotti, M.T., Cardoso, C., Pauletti, P., Gamboa, I.C., Bolzani, V.S., Velasco, M.V.R, Menezes, C.M.S, Ferreira, E.I., 2007. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Ver. Braz. J. Pharm.*, 43, 2, 153-166.
- Tang, W., Hioki, H., Harada, K., Kubo, K., Fukuyama, Y. J., 2007. Antioxidant Phenylpropanoid-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. *Nat. Prod.* 70, 2010–2013.
- Zanatta, C. F., Ugartondo, V., Mitjans, M., Rocha-Filho, P.A., Vinardell, M.P., 2008. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. *Food Chem. Toxicology* 46, 2776–2781.



CAPÍTULO 5

ARTIGO C

Estudos pré-clínicos para avaliação da permeação cutânea por espectroscopia fotoacústica e da segurança de nanoemulsão contendo extrato de *Trichilia catigua* (Catuaba)

Estudos pré-clínicos *in vivo* para avaliação da permeação cutânea por espectroscopia fotoacústica e da segurança de nanoemulsão contendo extrato de *Trichilia catigua* (Catuaba)

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni¹

Isabela Pacheco²

Maria Cristina DiCiaula¹

Francine Baesso Guimarães Astrath³

Marcos Luciano Bruschi¹

Mauro Luciano Baesso³

Eneri Leite Mello²

Maria Raquel Marcal Natali²

João Carlos Palazzo de Mello¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brasil.

²Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

³Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Autor correspondente: Dr. João Carlos Palazzo de Mello, Pharmacy Department, State University of Maringa, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil

E-mail address: mello@uem.br

Tel: +55 44 3011-4816

Fax: +55 44 3011-5050

Resumo

Com tamanho minúsculo e grande potencial, as nanopartículas tornaram-se uma inovação em produtos cosméticos e farmacêuticos, conferindo desempenho e eficácia aos produtos que fazem uso desta tecnologia. Neste sentido foi desenvolvida uma emulsão múltipla do tipo A/O/A contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* com altos teores de polifenóis e atividade antioxidante para uso cosmético. O extrato foi incorporado nas nanoemulsões em duas concentrações (0,5% p/p e 1,0% p/p). Em busca de assegurar a segurança das nanoemulsões e a permeação cutânea, o objetivo deste trabalho foi avaliar sua segurança por meio da análise da toxicidade, comedogenicidade e histopatologia em coelhos e aplicar a espectroscopia fotoacústica para determinar *ex vivo* a penetração cutânea da formulação. Os experimentos foram realizados em orelhas de coelhos albinos da raça *New Zealand*. O tratamento foi feito 2 vezes ao dia, durante 14 dias. Os resultados das análises histológicas, hematológicas e bioquímicas do sangue, mostraram que as formulações são seguras. A análise histopatológica mostrou que não houve reação tecidual em nenhum dos órgãos analisados (fígado e rins), comprovando ausência de toxicidade. A análise histológica mostrou que as formulações com e sem extrato de *T. catigua* não apresentaram comedogenicidade em relação ao grupo controle. Reações inflamatórias, eritema, descamação e acantose também não foram observadas nos animais tratados e nos controles. A espectroscopia fotoacústica demonstrou a presença do extrato de *T. catigua* contido nas formulações a 0,5% (p/p) e 1,0% (p/p) tanto na epiderme, quanto na derme.

Palavras Chave: *Trichilia catigua*; estudo histológico; espectroscopia fotoacústica; penetração percutânea.

Abstract

With tiny size and great potential, the nanoparticles became a breakthrough in cosmetic and pharmaceutical products, providing performance and effectiveness of products that use this technology. In this sense was developed a multiple emulsion W/O/W type containing standardized extract of *Trichilia catigua* with high levels of polyphenols and antioxidant activity for cosmetic use. The extract was incorporated in the nanoemulsions in two concentrations (0.5% w/w to 1.0% w/w). Seeking to ensure the safety of skin permeation and nanoemulsions, the objective of this study was to evaluate their safety through the analysis of toxicity, comedogenicity, and histopathology in rabbits and applied photoacoustic spectroscopy to determine *ex vivo* skin penetration of the formulation. The experiments were performed in the ears of albino rabbits *New Zealand*. Were treated twice day for 14 days. The results of histological, hematological and blood chemistry showed that the formulations are safe. Histopathological analysis showed not tissue reaction in any of the analyzed organs (liver and kidneys), confirming the absence of toxicity. Histological analysis showed that the formulations with and without extract of *T. catigua* not showed comedogenicity in the relation with the control group. Inflammatory reactions, erythema, desquamation and acanthosis were don't observed in treated and controls animals. The photoacoustic spectroscopy showed the

presence of the *T. catigua* extract in the formulations of the 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w) in the epidermis and the dermis.

Key words: *Trichilia catigua*; histological study, photoacoustic spectroscopy; percutaneous penetration.

5.1 Introdução

Conceitualmente a nanotecnologia pode ser definida como a ciência que estuda estruturas nanométricas, com tamanho equivalente à bilionésima parte do metro (10^{-9} m).

A busca da segurança de um produto deve incorporar permanentemente o avanço do estado da arte da ciência cosmética (BRASIL, 2003). Os testes de segurança que envolvem a utilização de produtos de uso tópico são realizados em animais (*in vivo*) ou alternativamente *in vitro*.

Testes em orelhas de coelhos são realizados desde a década de 50 para avaliar o efeito comedogênico e inflamatório de produtos tópicos, em função da semelhança com modelos humanos (KLIGMAN, KWONG, 1979; FULTON, PAY, FULTON JR, 1984; BRASIL, 2003; TRUITE et al., 2007; BERBICZ et al., 2011).

Na avaliação de segurança espera-se a manutenção dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em seus níveis fisiológicos. Analisa-se também o comportamento tecidual dos principais órgãos envolvidos na eliminação de qualquer xenobiótico, o fígado e os rins.

Nanoemulsões foram obtidas através das emulsões múltiplas, que são sistemas complexos compostos por duas emulsificações, onde os dois tipos de emulsões (A/O e O/A ou O/A e A/O) existem simultaneamente, constituindo emulsões do tipo A/O/A ou O/A/O (ASERIN, 2008). Devido à sua estrutura, esses sistemas múltiplos apresentam aplicações de microencapsulação nas áreas cosmética, farmacêutica (MA et al., 2006; MORAIS et al., 2006; HEMAR et al., 2010), e alimentícia (BONNET et al., 2009). Estes sistemas têm apresentado grande interesse por ter capacidade de dissolver ou dispersar ativos nas diversas fases, veicular componentes incompatíveis e instáveis, além de possibilitar a liberação com perfil modificado de substâncias ativas (TADROS, 2000; OZER et al., 2007).

A aplicação tópica de antioxidantes representa uma estratégia de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, buscam-se novas substâncias com ação antioxidante, bem como substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) apresenta grande capacidade antioxidante em exercer ações de proteção e/ou inibição dos radicais livres pelo teste de 2,2-difenil-1-picril-

hidrazil (DPPH) (DE BRUYNE et al., 1999; ALBRECHT et al., 2007; TANG et al., 2007; BRIGHENTE et al. 2007; RESENDE, 2011).

A espectroscopia fotoacústica (PAS) é uma técnica útil para a avaliação da penetração e distribuição de substâncias através da pele seja *in vitro*, *ex-vivo* e/ou *in vivo* (BAESSO, SNOOK, ANDREWS, 1994; BECKMANN et al., 2002; NOTINGHER; IMHOF, 2004; MITCHEM; MIO; SNOOK, 2004; SEHN et al., 2003; PEDROCHI et al., 2005; ROCHA et al., 2007; TRUITE et al., 2007). A PAS consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observada quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de desexcitação não radioativo. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma, que é detectada pelo microfone que resulta no sinal fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente. Assim, uma das características únicas deste método é a possibilidade de se determinar o perfil de penetração das substâncias ao longo da espessura da amostra em teste.

O objetivo deste trabalho foi aplicar PAS para a determinação *ex vivo* da penetração de formulação contendo extrato de *Trichilia catigua* para uso cosmético, avaliando sua segurança por meio da análise da toxicidade, comedogenicidade e histopatologia em coelhos.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1 Preparo da Formulação

As emulsões múltiplas do tipo A/O/A foram preparadas com óleo de canola pelo método de inversão de fases e contendo extrato de *T. catigua*, preparado segundo Lonni *et al.* (2012). Foram preparadas três formulações: sem ETC (emulsão base), com 0,5% (p/p) de ETC e com 1,0% (p/p) de ETC.

5.2.2 Animais

Foram utilizados 24 coelhos albinos da raça *New Zealand* provenientes da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá com peso médio de 2,2 kg. Os animais foram mantidos na FEI, em gaiolas individuais recebendo água filtrada e ração à vontade, providas de bebedouro automático, comedouro semi-automático e dispositivo para coleta das fezes. Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n° 022/2011, em anexo A).

5.2.3 Protocolo do estudo

Os animais foram distribuídos em quatro grupos, sendo 6 coelhos/grupo, da seguinte forma: G1 (grupo 1) como controle, onde as orelhas foram tratadas apenas com água destilada, G2 (grupo 2) como o controle da emulsão base, ou seja, a formulação sem adição de extrato, G3 (grupo 3) como o grupo que teve aplicação da emulsão com 1,0% de extrato e G4 (grupo 4) como o grupo que teve aplicação da formulação contendo 0,5% de extrato.

Durante 14 dias, 2 vezes ao dia, foram aplicados 1 mL das formulações, nas áreas côncavas das orelhas direita e esquerda dos animais de acordo com os respectivos grupos. As doses foram individualizadas em tubo eppendorf, vedado em papel alumínio e mantido em geladeira. Diariamente, as orelhas foram limpas com água destilada e o produto aplicado com auxílio de cotonete.

5.2.4 Avaliação macroscópica

As orelhas dos coelhos foram clinicamente observadas 2 vezes ao dia, durante 14 dias quanto à ocorrência de eritema, descamação epitelial, presença de comedos e reações inflamatórias, conforme Truitte e colaboradores (2007), obedecendo a seguinte escala (*score*): Comedos: (0) ausência; (1) presença de ≤ 5 comedos por cm^2 ; (2) presença de comedos ≥ 5 por cm^2 . Ocorrência de eritema, descamação epitelial e reação inflamatória: (0) ausência, (1) leve, (2) moderado, (3) severo.

5.2.5 Avaliação toxicológica

No 14° dia os animais foram anestesiados e mortos por dose letal de tiopental sódico (3x40 mg/kg de peso corporal), e imediatamente após foi realizada punção cardíaca e coletada uma alíquota de 10 mL de sangue para realização de análises hematológicas e bioquímicas. Foram coletadas amostras das orelhas de coelhos para análise do potencial comedogênico e para avaliação da permeação cutânea pela espectroscopia fotoacústica, bem como os órgãos do fígado e rim para estudo histológico.

As análises hematológicas incluíram a contagem de eritrócitos e leucócitos e foram realizadas por laboratório credenciado (Laboratório Grupo São Camilo, Maringá, Paraná) e as análises bioquímicas (dosagem de creatinina, proteínas totais, fosfatase alcalina, uréia e AST/ALT) foram realizadas por laboratório credenciado (Laboratório Grupo São Camilo, Maringá, Paraná) e as análises bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

5.2.6 Avaliação histológica

As amostras de 3 cm de comprimento das orelhas direita e esquerda dos coelhos foram fixadas em solução de Bouin por 12 h. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol, submetidas a inclusão em parafina e realizados cortes de 7 μm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, Nussloch, Alemanha) e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Após a coloração foi realizada a análise da amostra e comparação da mesma com o grupo controle. Para a análise dos órgãos, fígado e rins, foi realizado o mesmo procedimento com obtenção de cortes de 6 μm .

Na análise histológica foi avaliado o potencial comedogênico, acantose e presença de infiltrado inflamatório. Para avaliar o potencial comedogênico foi tomado como parâmetro o “score” de comedogenicidade adotado nos testes realizados pelo laboratório francês EVIC-CEBA, Laboratoire de Recherche et d’Experimentation (FULTON, PAY, FULTON JR, 1984; KLIGMAN; KWONG, 1979; TRUITE et al., 2007; BERBICZ et al., 2011).

Para cada orelha foi determinado um “score” individual resultante da soma dos comedos pequenos (diâmetro < 400 μm), médios (diâmetro entre 400 – 850 μm) e grandes (diâmetro > 850 μm). Este diâmetro foi mensurado com ocular micrometrada e objetiva de 10X, em microscópio Olympus CBB (Tokyo, Japão), sendo aplicado os fatores 0,5 para comedos pequenos, 2 para os comedos médios e 5 para os comedos grandes. A soma do “score” individual de cada amostra resultou no “score” médio (MSc), onde: nenhum potencial comedogênico $\text{MSc} \leq 10$; potencial comedogênico leve $10 < \text{MSc} \leq 30$; potencial comedogênico moderado $30 < \text{MSc} \leq 90$ e potencial comedogênico severo $\text{MSc} > 90$.

Para classificar a acantose e a presença de infiltrado inflamatório foi adotando a escala numérica de 0,5 a 3,0 e para a ausência destes parâmetros o valor numérico 0, conforme quadro 1.

Quadro 5.1 – Escala numérica para classificação de acantose e a presença de infiltrado inflamatório (densidade).

Escala numérica	Acantose		Infiltrado inflamatório
	espessura da epiderme	espessura do estrato córneo	
0	Sem espessamento	Sem espessamento	Ausência
0,5	Aumento de 10 a 50%	Discreto aumento	Aumento muito pequeno
1	Aumento de 51 a 100%	Discreto aumento	Aumento pequeno
2	Aumento de 101 a 150%	Aumento significativo	Aumento moderado
3	Acima de 150%	Aumento significativo	Severo aumento na densidade e presença marcante de eosinófilos e formação de abscessos córneos

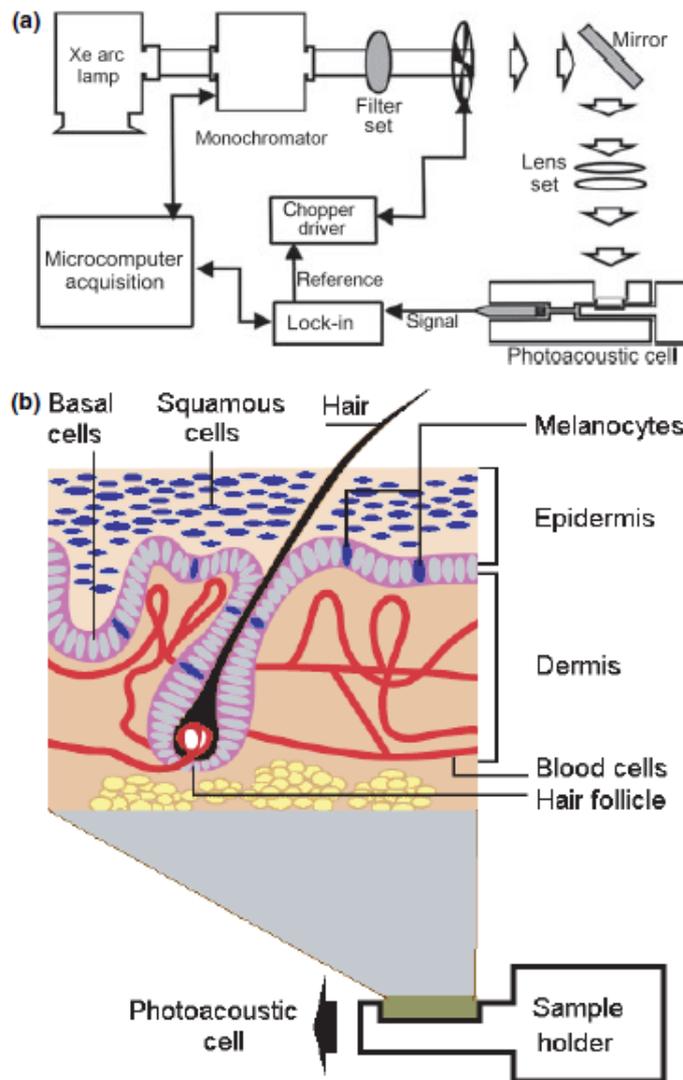
5.2.7 Penetração percutânea avaliada

As espessuras das amostras foram no intervalo entre 0,2 a 0,5 milímetros, aproximadamente. Para a determinação ou não da permeação da formulação na pele do animal, as medidas foram realizadas na superfície da epiderme e da derme.

5.2.8 Medidas de espectroscopia fotoacústica

As medidas de espectroscopia fotoacústica foram avaliadas usando o esquema experimental representado na Figura 5.1. Foi utilizada luz monocromática obtida de uma lâmpada de xenônio 1000 W de potência (Oriental Corporation 68820) e um monocromador (modelo 77250; Oriental Instrumentos). O feixe de luz foi modulado por um chopper. A célula fotoacústica foi projetada para se ter um volume mínimo, de modo que as amostras apresentaram dimensões máximas de cerca de 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. O microfone utilizado foi um Bruel & Kjaer, modelo 2639. O amplificador lock-in é da EG & G Instrumentos (modelo 5110). Todos os espectros da fotoacústica foram obtidos numa frequência de modulação de 15 Hz e gravado entre 200 a 800 nm. A aquisição de dados foi realizada utilizando-se um computador e os espectros de PAS foram normalizados com o espectro do carvão.

Figura 5.1 – Esquema demonstrando a configuração experimental da espectroscopia fotoacústica (a). Detalhes da amostra de pele na célula fotoacústica (b).



Fonte: Truite et al., 2007

Na medida fotoacústica, o comprimento de difusão térmica (μ_s) fornece a profundidade na amostra no qual o calor gerado contribui para o sinal (BENTO et al., 2002). Para avaliar μ_s , a difusividade térmica deve ser conhecida com antecedência. Com baixas frequências faz-se inspeção em camadas mais profundas (abaixo da superfície da epiderme), enquanto frequências mais elevadas monitoram a superfície da pele. Em seguida, considerando-se a frequência de modulação de luz a 15 Hz e difusividade da pele como $d = 4,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (BROWN et al., 1993), o comprimento de difusão térmica (μ_s) nas medições pode ser estimado como $\mu_s \sim 25 \text{ }\mu\text{m}$. Esta profundidade de penetração pode não ser constante ao longo do espectro porque o comprimento de absorção óptica l_β e o tempo de relaxação não

radiativa τ podem mudar, especialmente na região de alta absorção óptica. Para garantir a detecção da substância ativa propagada através das camadas da pele, as amostras foram excitadas primeiramente na superfície epidérmica (face externa da amostra), como mostradas na Figura 1b, e depois medidas na superfície dérmica (face interna da amostra). Dessa forma, considerando que a espessura de prova foi da ordem de 25 μm e a espessura da amostra da pele da ordem de 500 μm , a banda de absorção óptica da formulação foi detectada na parte da derme da amostra demonstrando que as substâncias aplicadas na epiderme propagaram através da pele.

Pode-se afirmar que as leituras tomadas para todos os animais, incluindo o extrato de *T. catigua* e a emulsão base, foram sistematicamente analisados da mesma maneira. Foram realizadas medidas em 4 grupos de animais denominadas G1, G2, G3 e G4, assim como também, o extrato puro e a base utilizadas na preparação das concentrações da formulação.

5.2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Em seguida, realizou-se ANOVA e o Teste de Tukey para comparação entre todos os pares de grupos em todas as análises. Para ambos os testes, o nível de significância de 5% e as diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Análise macroscópica e histológica

Não foram observadas alterações de cor, textura ou temperatura nos animais de todos os grupos, tais como eritema, edema, descamação epitelial e reações inflamatórias, em qualquer grupo tratado, conforme pode ser observado na Figura 5.2.

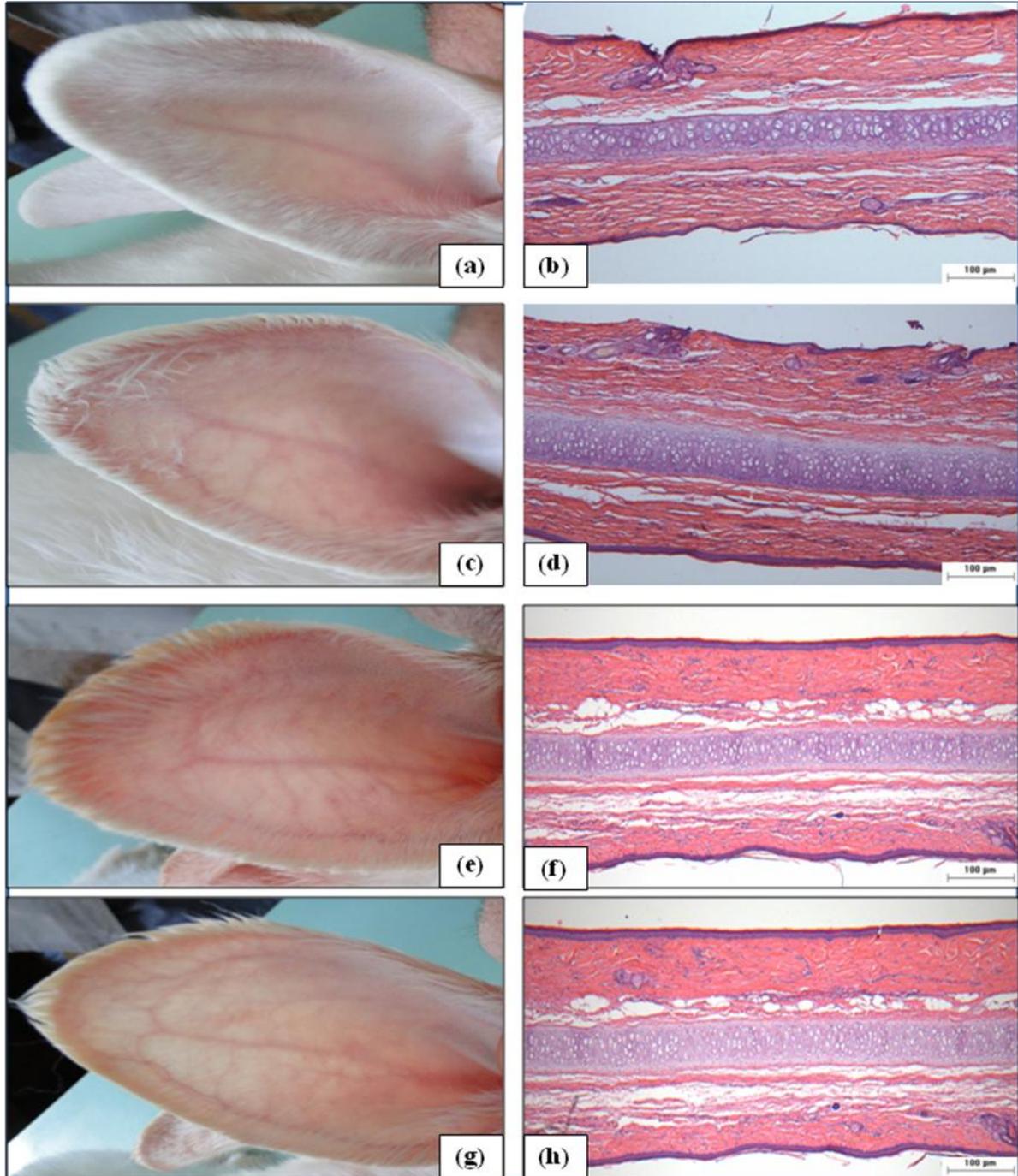
Na análise histológica observou-se que todas as formulações promoveram respostas de menor intensidade quando comparadas às orelhas controle, nas quais foram utilizadas a água destilada (G1) e a emulsão base (G2). Na avaliação do potencial comedogênico, verificou-se que foi igual ao controle e dessa forma todos os grupos apresentaram potencial comedogênico leve (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Avaliação de acantose e potencial comedogênico de orelhas de coelhos em todos os grupos (n = 6/grupo), onde G1: controle; G2: controle da emulsão base; G3: emulsão com 1,0% (p/p) ETC e G4: emulsão com 0,5% (p/p) ETC.

Grupos	G1	G2	G3	G4
Acantose (μm)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Potencial comedogênico (Msc)	18,17 \pm 4,07 (leve)	18,17 \pm 4,12 (leve)	16,83 \pm 3,19 (leve)	15,17 \pm 3,31 (leve)

Potencial comedogênico: valor < 10 (nenhum), 10 < valor \leq 30 (suave), 30 < valor \leq 90 (moderado), valor > 90 (severo). Avaliação com teste de Tukey com significância $p < 0,05$.

Figura 5.2 – Imagens macroscópicas (esquerda) e histológicas (direita) de orelhas de coelhos. Grupo controle - G1 (a, b); Controle da emulsão base - G2 (c,d); e, f) Tratado com a emulsão com 1,0% (p/p) ETC - G3 (e,f); Tratado com a emulsão com 0,5% (p/p) ETC – G4 (g, h). Coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina.



5.3.2 Avaliação Toxicológica

Na análise de toxicidade nenhuma das formulações apresentou efeito tóxico para os animais tratados, avaliados por meio dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, conforme Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Avaliação hematológica e bioquímica das orelhas controle (G1); controle emulsão base (G2); emulsão com 1,0% (p/p) de ETC (G3) e emulsão com 0,5% (p/p) de ETC (G4).

Grupos	G1	G2	G3	G4
Eritrócitos (milh/ μ L)	7,20 \pm 0,40	6,77 \pm 0,47	6,48 \pm 0,28	6,17 \pm 0,16
Leucócitos (μ L)	7865 \pm 72,34	8058 \pm 97,93	7722 \pm 103,78	7905 \pm 54,47
Creatinina (mg/dL)	1,36 \pm 0,10	1,28 \pm 0,22	1,20 \pm 0,08	1,23 \pm 1,23
Albumina (mg/dL)	4,25 \pm 0,20	4,31 \pm 0,19	4,16 \pm 0,07	4,12 \pm 0,03
Proteínas Totais (g/dL)	5,39 \pm 0,29	5,55 \pm 0,13	5,70 \pm 0,19	5,91 \pm 0,30
Fosfatase Alcalina (U/L)	241,60 \pm 58,87	191,20 \pm 33,10	239,33 \pm 26,63	189,80 \pm 42,65
Uréia (mg/dL)	41,17 \pm 4,45	46,17 \pm 3,13	47,50 \pm 3,11	46,67 \pm 6,37
AST (U/L)	27,50 \pm 13,69	27,00 \pm 6,87	21,00 \pm 4,76	22,00 \pm 4,16
ALT (U/L ⁻¹)	57,00 \pm 6,60	42,00 \pm 11,21	41,00 \pm 5,72	37,00 \pm 8,25

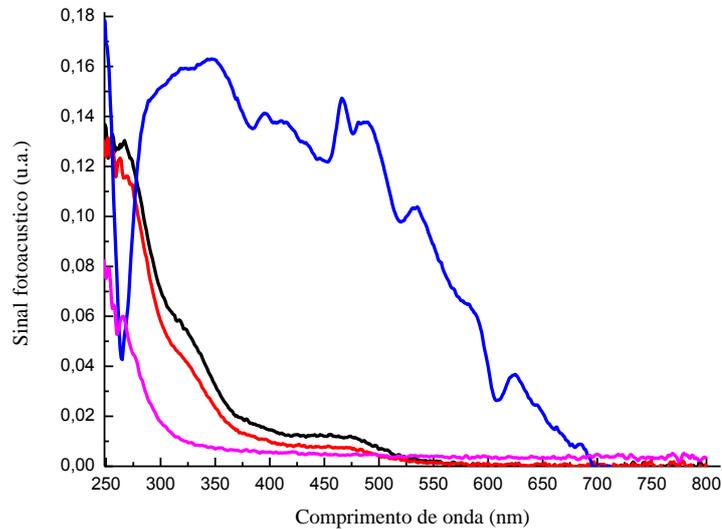
AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase. Avaliação de cada parâmetro com teste de Tukey com significância $p > 0,05$, mostrando que não houve alterações significativas em relação ao controle.

5.3.3 Análise da Permeação Cutânea por Fotoacústica

Para que seja possível observar se houve ou não permeação do extrato na pele do animal, é necessário medir os espectros de absorção óptica do extrato de *T. catigua* (ETC), das emulsões base (G2), das emulsões com 1,0% (p/p) de ETC (G3) e das emulsões com 0,5% (p/p) de ETC (G4), conforme pode ser visto na Figura 3, para depois analisar as medidas realizadas na epiderme e derme do mesmo.

Observa-se na figura 5.3 que a curva azul representando o extrato padronizado de *T. catigua* (ETC) é bem diferente das demais, pelo fato dela não possuir nenhuma contribuição na pele, pois, a própria emulsão foi colocada na célula fotoacústica. Já a curva rosa representa apenas a pele do coelho contendo a emulsão base (sem o extrato), denominado animal controle, que será usado para comparações com os animais tratados. As demais curvas, vermelha e preta, são as representações dos animais tratados com as formulações com 0,5 % ETC e 1,0% ETC, respectivamente.

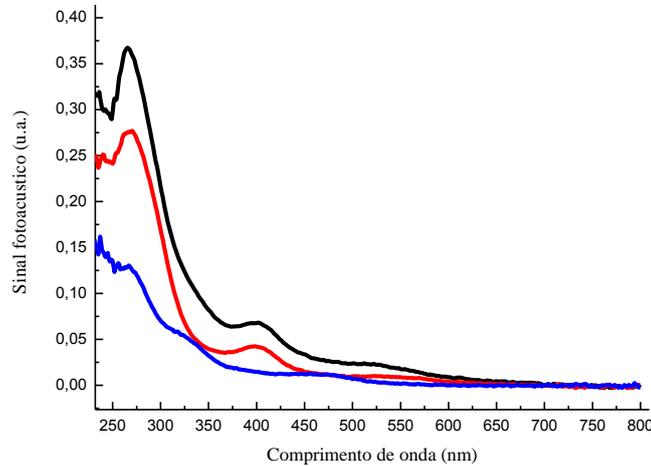
Figura 5.3 – Espectros de absorção óptica do extrato de *T. catigua* (—) e da pele da orelhas dos coelhos após a aplicação de emulsão base (—), com 1,0% (p/p) de ETC (—) e com 0,5% (p/p) de ETC (—).



Em seguida, os dados obtidos dos animais tratados foram comparados. A Figura 5.4 mostra a comparação de um animal do grupo 3 (curva preta) com um animal controle do grupo 1 (curva vermelha) e também com a emulsão com 1,0% ETC (curva azul). É possível observar que há diferenças entre as curvas e que aquelas que representam os animais não são iguais. Observa-se em 350 nm, por exemplo, a curva vermelha (G1), que representa o animal controle, não possui nenhuma banda em evidência. Já para a curva preta (G3), no qual o animal foi tratado com a emulsão com 1,0% ETC, observa-se uma banda parecida com a da curva azul, indicando que há, portanto, a soma da pele do animal controle mais a formulação, provando que esse animal possui a formulação na pele (epiderme). É importante mencionar que as bandas de absorção em torno de 400 nm e 550 nm são provenientes de resíduos de sangue presentes nas amostras.

Para que seja possível observar se houve ou não permeação do extrato na pele do animal, é necessário analisar as medidas realizadas na derme do mesmo. Se for detectada a presença do extrato na derme, significa dizer que o ativo, no caso, o extrato, ultrapassou as camadas da epiderme permeando para a derme.

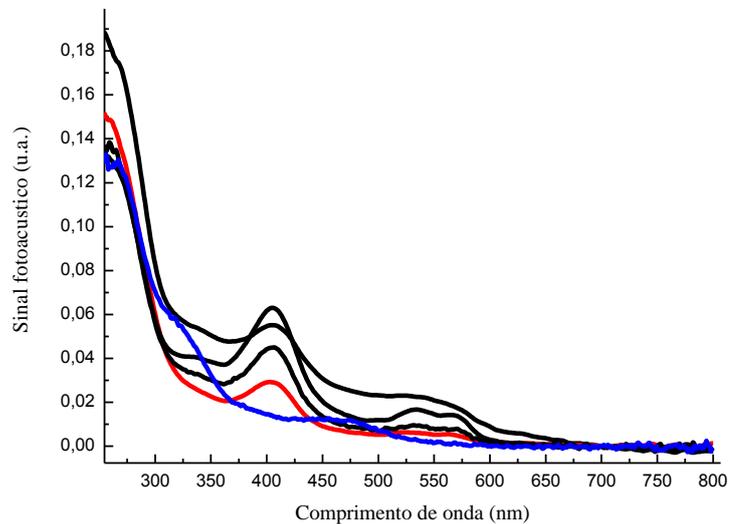
Figura 5.4 – Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz na superfície epidermal das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de *T. catigua* (—) e o espectro da emulsão com extrato de *T. catigua* 1,0% (—)



A Figura 5.5 mostra o gráfico que representa as medidas obtidas a partir das leituras na face dermal dos animais tratados do G3 comparadas aos animais controle G1 e também comparadas à emulsão com 1,0% de ETC. É possível notar que a curva vermelha que representa o animal controle, é a mesma que nos gráficos seguintes, ou melhor, dizendo, ela não possui nenhuma banda relevante por ser um animal tratado sem nenhum ativo. A curva verde que representa apenas a emulsão com 1,0% de ETC apresenta bandas de absorção da formulação permitindo comparar as demais curvas nas quais a emulsão com 1,0% de ETC foi aplicada. Fica evidente em alguns comprimentos de onda, principalmente em 350 e 470 nm, que há bandas de absorção semelhantes às do extrato e que ao mesmo tempo não são vistas na do animal controle, mostrando mais uma vez, que houve permeação do extrato para a derme dos animais. Nota-se neste caso que em razão da medida ser realizada na região da derme, que é vascularizada, as bandas de absorção do sangue, em torno de 400 e 550 nm, são bem mais intensas dificultando a detecção da formulação.

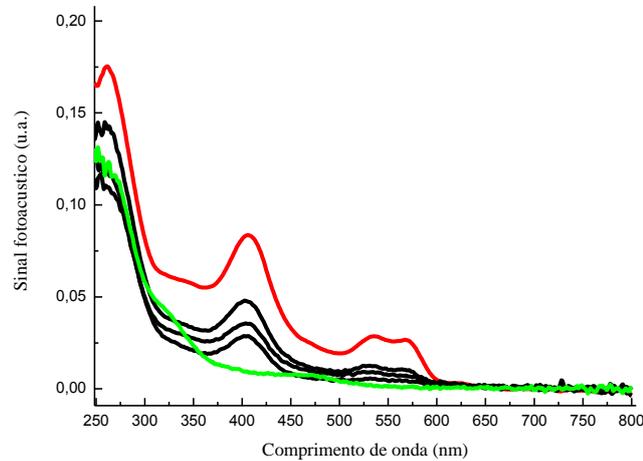
O mesmo procedimento utilizado no tratamento dos dados do G3 foi feito para o G4, agora tratados com formulação contendo 0,5% do extrato de *T. catigua*.

Figura 5.5 – Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces inferiores (derme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 1,0% de extrato de *T. catigua* (—) e o espectro da emulsão com extrato de *T. catigua* 1,0% (—).



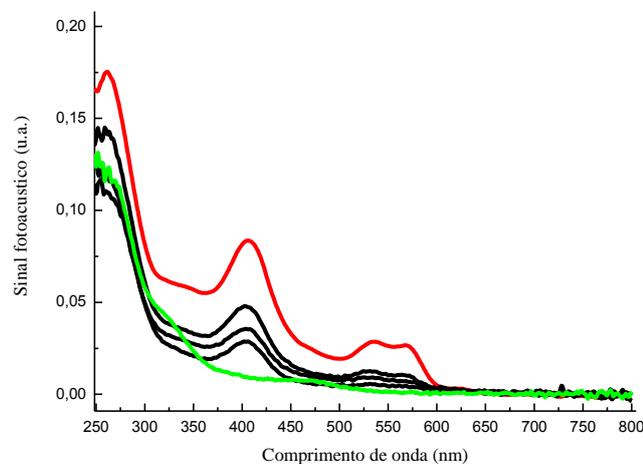
A Figura 5.6 mostra a comparação das medidas realizadas na epiderme em um animal controle água do G1 (curva vermelha), em três animais tratados do G4 e, para comparação, a emulsão com 0,5% de ETC (curva verde). Novamente é possível observar a diferença em algumas bandas de absorção, principalmente em 350 e 470 nm, se comparadas à banda no animal controle. Este fato denota a presença da formulação na pele dos três animais.

Figura 5.6 – Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces superiores (epiderme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de *T. catigua* (—) e o espectro da emulsão com extrato de *T. catigua* 0,5% (—).



A Figura 5.7 mostra os espectros dos mesmos animais e a formulação, mas agora observado pela derme dos animais. Como nos dados anteriores, é possível notar a diferença entre as bandas de absorção, mostrando mais uma vez que houve permeação do extrato para a derme dos animais, mesmo com a emulsão contendo a metade de extrato.

Figura 5.7 – Espectros obtidos com uma frequência de 21 Hz nas interfaces inferiores (derme) das peles das orelhas dos coelhos após aplicação de água (—), emulsão com 0,5% de extrato de *T. catigua* (—) e o espectro da emulsão com extrato de *T. catigua* 0,5% (—).



Nota-se que a detecção da permeação nos animais tratados com 1% da formulação (EMCTC1) ficou mais evidente do que os animais tratados com a formulação contendo 0,5%

T. catigua, mostrando que a permeação é dependente da concentração. Além disso, a nanoemulsão por conter moléculas de tamanho reduzido também apresenta maior permeação.

Ressalta-se que a interpretação da análise foi dificultada, pois se constatou a presença de sangue em todas as amostras de pele, mas que pode ser considerado um erro sistemático, por se tratar do procedimento histológico adotado para este tipo de experimento.

5.4 Conclusão

Os resultados das análises histológicas, hematológicas e bioquímicas do sangue, mostraram que as formulações são seguras nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, podendo seu uso ser favorável.

As formulações a 0,5 e 1% contendo extrato de *T. catigua* não apresentaram comedogenicidade.

A análise histopatológica mostrou que não houve reação tecidual em nenhum dos órgãos analisados, comprovando ausência de toxicidade.

A Espectroscopia Fotoacústica demonstrou a presença de extrato padronizado contido nas formulações na epiderme e na derme.

Referências

- ALBRECHT, I.; ITO, A. A.; RESENDE, F. O.; MELLO, J. C. P. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA, 1., 2007, Maringá. *Anais...* Maringá, 2007. p. 159.
- ASERIN, A. *Multiple emulsions: technology and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- BAESSO, M. L.; SNOOK, R. D.; ANDREWS, J.J. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy to study the penetration of substances through skin. *Journal of Physique*, v. 4, C7, p.449–451, 1994.
- BECKMANN, D.; LAUCKNER, G.; SCHMIDT, K.; ASMUSSEN, B.; HORSTMANN, M.; KOCH, A.; THEOBALD, F. Photoacoustic investigations on the penetration of drugs from transdermal therapeutic systems through human skin: use of photoacoustic spectroscopy to obtain concentration-depth-profiles of drugs in human skin after the application of transdermal therapeutic systems. *Pharmacie Industrielle*, Paris, v. 64, n. 3, p. 271–277, 2002.
- BENTO, A. C.; DIAS, D. T.; OLENKA, L.; MEDINA, A. N.; BAESSO, M. L. On the application of the photoacoustic methods for the determination of thermo-optical properties of polymers. *Brazilian Journal Physics*, São Paulo, v. 32, n. 2, p.483-494, 2002.
- BERBICZ, F.; NOGUEIRA, A.C.; MEDINA NETO, A.O ; NATALI, M.R.M.; BAESSO, M.L.; MATIOLI, G. Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of benzophenone-3-hydroxypropyl- -cyclodextrin and ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Netherlands, v. 1, p. 1-7, 2011.
- BONNET, M.; CANSELL, M.; BERKAOUI, A.; ROPERS, M. H.; ANTON, M.; LEAL-CALDERON, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, United States, v. 23, p. 92-101, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, v. 1, 2003.
- BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, England, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.
- BROWN, S. M.; BAESSO, M. L.; SHEN, J.; SNOOK, R. D. Thermal diffusivity of skin measured by two photothermal techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 282, n. 3, p. 711-19, 1993.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, p. 445-459, 1999.
- FULTON, J. E.; PAY, S. R.; FULTON JR., E. Comedogenicity of current therapeutic products, cosmetics and ingredients in the rabbit ear. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 10, n. 1, p. 96-105, 1984.

- HEMAR, Y.; CHENG, L.J.; OLIVER, C.M.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water Double emulsions. *Food Biophysics*, v. 5, p. 120-127, 2010.
- KLIGMAN, A. M.; KWONG, T. An improved rabbit ear model for assessing comedogenic substances. *British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 100, n. 6, p. 699-702, 1979.
- LONNI, A.A.S.G., LONGHINI, R., LOPES, G.C., MELLO, J.C.P. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 719, p. 57-60, 2012.
- MA, E. L., HA, H.; LIU, Z.; ZHENG, C. X.; DUAN, M. X. In vitro and in vivo evaluation of a novel oral insulin formulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, Beijing, v. 27, n. 10, p.1382-1388, Oct. 2006.
- MITCHEM, L., C. MIO; SNOOK, R. D. Diffusion of transdermally delivered nitroglycerin through skin mimetics using photoacoustic and attenuated total reflectance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 511, n. 2, p. 281–288, May 2004.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, United States, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2006.
- NOTINGHER, I.; IMHOF, R. E. Mid-infrared in vivo depth-profiling of topical chemicals on skin. *Skin Research Technology*, Copenhagen, v. 10, n. 2, p. 113-121, May 2004.
- OZER, O., OZYAZICI, M., TEDAJO, M.; TANER, M.S.; KÖSEOĞLU, K. W/O/W multiple emulsions containing nitroimidazole derivatives for vaginal delivery. *Drug Delivery*, Orlando, v. 14, n. 3, p.139-145, Mar. 2007.
- PEDROCHI, F., E. SEHN, A. N. MEDINA, A. C. BENTO, M. L. BAESSO, A. STORCK AND J. L. GESZTESI. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo. *Journal of Physique*, v.125, p.757–759, 2005.
- RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J.C.P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2087-2093, 2011.
- ROCHA, J. C. B., F. PEDROCHI, L. HERNANDES, J. C. P. DE MELLO AND M. L. BAESSO. Ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 587, n. 1, p. 132–136, 2007.
- SEHN, E.; SILVA, K. C.; RETUCI, V. S.; MEDINA, A. N., BENTO, A. C.; BAESSO, M. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistical treatment. *Review of Scientific Instruments*, v. 74, p. 758-760, 2003.
- TADROS, T. Science and technology of emulsions-from nanoemulsions to multiple emulsions. *IFSCC magazine*, v. 3, p. 31-38, 2000.

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 12, p. 2010-2013, 2007.

TRUITE, C. V. R.; PHILIPPSEN, G. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; NAKAMURA, C. V. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. *Photochemistry and Photobiology*, v. 83, p. 1529-1536, 2007.



Fonte: <http://sonhosdesperto.blogspot.com/2011/02/o-rostoeo-eselho.html>

CAPÍTULO 6

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- O método quimiométrico utilizado propiciou a obtenção de um extrato padronizado constituído de água, metanol, acetona e etanol (1:1:1:1 v/v) a partir das cascas de *Trichilia catigua* (ETC).
- A emulsão múltipla (EM) do tipo A/O/A foi preparada por etapa única com óleo de canola e incorporado o ETC a 0,5 e 1,0% (p/p), caracterizada como nanoemulsão. A temperatura controlada de 78 ± 2 °C foi fundamental na obtenção da emulsão múltipla. Os parâmetros pH, condutividade, teor em polifenóis totais, organolépticos e tamanho de micela caracterizaram a EM sem e com ETC a 0,5 e 1,0%. As EMs mostraram perfil reológico Não-Newtoniano pseudoplástico.
- O perfil de liberação *in vitro* em célula de Franz demonstrou que o ETC pode ser liberado de forma controlada por um período de 16 h na emulsão múltipla de canola contendo o extrato padronizado de *Trichilia catigua* a 1%, e 23 h na EM a 0,5%.
- Na avaliação da permeação cutânea das formulações a 0,5 e 1% contendo extrato de *Trichilia catigua* por espectroscopia fotoacústica, constatou-se a presença do extrato de *Trichilia catigua* na epiderme e derme dos animais. A detecção da permeação nos animais tratados com 1% da formulação foi mais evidente que a 0,5%.
- As formulações estudadas são seguras nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, podendo seu uso ser favorável, avaliadas por meio de análises hematológicas, bioquímicas de sangue, histológica e histopatológica em coelhos.
- As formulações a 0,5 e 1% contendo extrato de *T. catigua* não apresentaram comedogenicidade.
- Na avaliação da estabilidade química, a formulação sem ETC se mostrou instável, com floculação, a baixa temperatura (-20 °C). As formulações contendo 0,5% e 1,0% de ETC apresentaram diminuição do teor de polifenóis, à temperatura elevada (40 °C) ao final do período analisado (90 dias), entretanto somente a formulação a 1,0% apresentou separação de fases.



Referências

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, I.; ITO, A. A.; RESENDE, F. O.; MELLO, J. C. P. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA, 1., 2007, Maringá. *Anais...* Maringá, 2007. p. 159.
- ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotherapy Research*, London, v.15, n. 5, p.416-421, Aug. 2001.
- ASERIN, A. *Multiple emulsions: technology and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- AVENDANO-GOMEZ, J.R.; GROSSIORD, J.L.; CLAUSSE, D. Study of mass transfer in oil-water-oil multiple emulsions by differential scanning calorimetry. *Journal of Colloid and Interface Science*, New York, v. 290, n. 2, p. 533-545, Oct. 2005.
- BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss. (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.
- BAESSO, M. L.; SNOOK, R. D.; ANDREWS, J. J. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy to study the penetration of substances through skin. *Journal de Physique IV*, v. 4, C 7, p.449–451, 1994.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. Campinas: Ed. da Unicamp, 2002. p. 309-332.
- BECKMANN, D.; LAUCKNER, G.; SCHMIDT, K.; ASMUSSEN, B.; HORSTMANN, M.; KOCH, A.; THEOBALD, F. Photoacoustic investigations on the penetration of drugs from transdermal therapeutic systems through human skin: use of photoacoustic spectroscopy to obtain concentration-depth-profiles of drugs in human skin after the application of transdermal therapeutic systems. *Pharmacie Industrielle*, Paris, v. 64, n. 3, p. 271–277, 2002.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: a practical guide*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BELTRAME, F. L. *Caracterização de duas espécies vegetais (Trichilia catigua e Anemopaegma arvense) usadas como “Catuaba” por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada*. 2005. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BELTRAME, F. L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography*, Netherlands, v. 1119, p. 257-263, 2006.

BENECH-KIEFFER, F., WEGRICH, P., SCHWARZENBACH, R., KLECAK, G., WEBER, T., LECLAIR, J., SCHAEFER, H. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, Switzerland, v. 13, p. 324-335, 2000.

BERBICZ, F.; NOGUEIRA, A.C.; MEDINA NETO, A.O ; NATALI, M.R.M.; BAESSO, M.L.; MATIOLI, G. Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of benzophenone-3-hydroxypropyl- -cyclodextrin and ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Netherlands, v. 1, p. 1-7, 2011.

BONNET, M.; CANSELL, M.; BERKAOUI, A.; ROPERS, M. H.; ANTON, M.; LEAL-CALDERON, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, United States, v. 23, p. 92-101, 2009.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, v.1, 2003.

_____. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, 2004.

_____. *Guia para a realização de estudos de estabilidade*. Brasília: ANVISA, 2005.

_____. *Resolução - RDC nº 50, de 20 de setembro de 2011*. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2011.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, England, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. *Statistical design: chemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 2006.

BRUSCHI, M. L. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. 2006. 318 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências de Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 54-57, 2002.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytotherapy Research*, England, v. 11, p. 32-38, 1997.

CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (*Catuaba*) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 182, p. 45-53, 2005.

- CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 137, n. 3, p. 1143-1148, 2011.
- CHORILLI, M.; PRADO, M. C. A.; POLACOW, M. L. O.; PIRES-DE-CAMPO; M. S. S. M.; LEONARDI, G. R. Efeitos de bases dermocosméticas na hidratação da pele. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, v. 15, p. 56-58, 2003.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DOS ANJOS, F.H.; ROMPE, P.C.B.; MANSANARES, A. M. Sunscreen effects in skin analyzed by photoacoustic spectroscopy. *Journal de Physique IV*, v.125, p.797-799, 2005.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FELIPE, A. M. M.; RINCÃO, V. P.; BENATI, F. J.; LINHARES, R. E. C.; GALINA, K. J.; TOLEDO, C. E. M.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and bovine herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.
- FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. *Cosmetics Toiletries*, São Paulo, v. 18, p. 7-10, 2006.
- FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*, Baltimore, v. 64, n. 3, p.190-195, 1975.
- FULTON, J. E.; PAY, S. R.; FULTON JR., E. Comedogenicity of current therapeutic products, cosmetics and ingredients in the rabbit ear. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 10, n. 1, p.96-105, Jan. 1984.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; TSUTSUMI, M. T.; ROQUE, N. F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, St. Louis, v. 45, n. 1, p. 141-148, 1997.
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.
- HAIR, J. F., Jr; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. *Análise multivariada de dados*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.
- _____. *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- HATTORI, M.; KUSUMOTO, L. T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 38, p. 717-720, 1990.

- HEMAR, Y.; CHENG, L.J.; OLIVER, C.M.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water Double emulsions. *Food Biophysics*, New York, v. 5, p. 120-127, 2010.
- HOLETZ, F. B.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 397-401, jul. 2005.
- HWANG, Y-J.; OH, C.; OH, S-G. Controlled release of retinol from silica particles prepared In O/W/O emulsion: the effects of surfactants and polymers. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 229-349, Sep. 2005.
- ICH. *International conference on the harmonization of stability testing guidelines: stability testing of new drug substances and products*. Q1(R2). Committee for proprietary medicinal products. London: ICH, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Brasil em síntese*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/brasil_em_sintese/populacao04.htm>. Acesso em: 12 mar. 2008.
- KLEIN, R.M. *Flora ilustrada catarinense: meliáceas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. p. 55-60.
- KLIGMAN, A. M.; KWONG, T. An improved rabbit ear model for assessing comedogenic substances. *British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 100, n. 6, p. 699-702, 1979.
- LAGOS, J. B.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., *Meliaceae*). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 2, p. 185-190, 2007.
- LEONARDI, G. R. *Cosmetologia aplicada*. 2. ed. São Paulo: Santa Isabel, 2008.
- LOBATTO-CALLEROS, C.; RODRIGUEZ, E.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VERNON-CARTER, E.J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsion: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, Ottawa, v. 39, p. 678-685, 2006.
- LONNI, A. A. S. G., SCARMINIO, I. S.; E SILVA, L. M. C., FERREIRA, D. T. Differentiation of species of the baccharis genus by HPLC and chemometric methods. *Analytical Sciences*, Tokyo, v. 19, n. 7, p. 1013-1017, Jul. 2003.
- LONNI, A. A. S. G., E SILVA, L. M. C., FERREIRA, D. T., SCARMINIO, I. S. Numerical Taxonomy Characterization of Baccharis Genus Species by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Analytical Sciences*, Tokyo, v. 21, n. 3, p. 235-239, Mar. 2005.
- LONNI, A.A.S.G., LONGHINI, R., LOPES, G.C., MELLO, J.C.P. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 719, p. 57-60, 2012.
- LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E., RASO, P., TAFURI, W.L. *Bogliolo patologia*. 4. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 99, p. 265-272, 2005.
- MA, E. L., HA, H.; LIU, Z.; ZHENG, C. X.; DUAN, M. X. In vitro and in vivo evaluation of a novel oral insulin formulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, Beijing, v. 27, n. 10, p.1382-1388, Oct. 2006.
- MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: _____. *Cosmetologia: com questões de avaliação*. Rio de Janeiro: Rubio, 2000. p.33-42.
- MARQUES, L. C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. *Revista Racine*, São Paulo, v. 3, n. 43, p. 8-11, 1998.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides: review. *Phytochemistry*, Oxford, v. 24, p. 639-652, 1985.
- MELLINGER, M. Multivariate data analysis: its methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, p. 29-36, 1987.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. Cap. 24, p. 517-544.
- MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Etnopharmacology*, Lausanne, v. 109, n. 3, p. 493-500, Feb. 2007.
- MITCHEM, L., C. MIO; SNOOK, R. D. Diffusion of transdermally delivered nitroglycerin through skin mimetics using photoacoustic and attenuated total reflectance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 511, n. 2, p. 281-288, May 2004.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, United States, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2006.
- NOTINGHER, I.; IMHOF, R. E. Mid-infrared in vivo depth-profiling of topical chemicals on skin. *Skin Research Technology*, Copenhagen, v. 10, n. 2, p. 113-121, May 2004.
- NUGLISCH, L.; DIAS, D. T.; SEHN, E. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. *Journal de Physique IV*, v. 125, p. 631-633, 2005.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 1-31, 1989.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v. 32, n. 3, p. 507-521, 1993.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, Basel, v. 27, p. 124-129, 1993.

OZER, O., OZYAZICI, M., TEDAJO, M.; TANER, M.S.; KÖSEOGLU, K. W/O/W multiple emulsions containing nitroimidazole derivatives for vaginal delivery. *Drug Delivery*, Orlando, v. 14, n. 3, p.139-145, Mar. 2007.

PEDROCHI, F., E. SEHN, A. N. MEDINA, A. C. BENTO, M. L. BAESSO, A. STORCK AND J. L. GESZTESI. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo. *Journal de Physique IV*, v.125, p.757-759, 2005.

PELLATI, F.; STEFANIA, B.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinaceae* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v. 35, n. 2, p. 289-301, 2004.

PEREIRA, N. A. *Contribuição de Manuel Freire Alemão de Cisneiros para o conhecimento de nossos fitoterápicos*. Rio de Janeiro: Brasileira de Artes Gráficas, 1982.

PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E. F. A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeitschrift der Naturforschung*, v. 57, n. 5-6, p. 483-488, May/Jun. 2002a.

PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, Stuttgart, v. 9, p. 422-426, 2002b.

_____. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, Stuttgart, v. 10, n. 5, p.422- 425, 2003.

PONTIERI, V.; SCALABRINI NETO, A.; DE FRANÇA-CAMARGO, A. F.; KOIKE, M. K.; VELASCO, I. T. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *Journal of Electrocardiology*, New York, v. 40, p. 534-8, 2007.

QUINTÃO, N. L. M.; FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama® in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, v.15, p.245-252, 2008.

RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2087-2093, 2011.

RIBEIRO, C. *Cosmetologia aplicada a dermocosmética*. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v.2, n.4, p.152-159, 1997.

- ROCHA, J. C. B.; PEDROCHI, F.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P.; BAESSO, M. L. Ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Analalytica Chimica Acta*, v.587, p.132–136, 2007.
- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p.1-7, 2005.
- SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H. R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GOEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S. A. M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.8, n.2, p.33-152, 2000.
- SCARMINIO, I. S. *Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações*. 1989. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p.153-165, 2007.
- SEHN, E.; SILVA, K. C.; BENTO, A. C. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: In vivo test in humans. *Journal de Physique IV*, v.125, p.681-683, 2005.
- SEHN, E.; SILVA, K. C.; RETUCI, V. S.; MEDINA, A. N., BENTO, A. C.; BAESSO, M. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistical treatment. *Review of Scientific Instruments*, v.74, p.758–760, 2003.
- SIMON, G.A., MAIBACH, H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 13, p. 229-234, 2000.
- SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S .M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.44, n.4, p.383-394, 2001.
- TADROS, T. Science and technology of emulsions-from nanoemulsions to multiple emulsions. *IFSCC Magazine*, v. 3, p. 31-38, 2000.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Natural Products*, v.70, n.12, p.2010-2013, 2007.
- TRUITE, C. V. R.; PHILIPPSEN, G. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; NAKAMURA, C. V. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. *Photochemistry and Photobiology*, v.83, p.1529-1536, 2007.

URSICA L.; TITA D.; PALICI, I.; TITA, B.; VLAIA, V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, n.5, p.931-936, 2005.

VAS, Z. R.; MATA L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytotherapy Res.*, v.11, p. 101-106, 1997.

VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive Activity of *Trichilia catigua* Hydroalcoholic Extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, v. 6, p.1-8, 2009.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I; NISHIOKA, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*, v. 56, p. 213-222, 1998.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Finalizar os estudos de estabilidade acelerada até 180 dias.
- Estudos de eficácia *ex vivo*
 - Analisar o teor de colágeno nas orelhas dos coelhos liofilizadas.
- Estudos clínicos em seres humanos
 - Elaboração do documento para o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 - Avaliar a biometria cutânea
 - Teor lipídico
 - Hidratação
 - pH cutâneo
 - Perda transepidérmica de água
 - Teor de melanina



Anexos

Anexo A

Parecer Comitê de Ética

 Universidade Estadual de Maringá Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação			
Parecer emitido após reunião realizada em: 3 / 5 / 2011		Parecer nº 022/2011	
Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello		Setor: DFF	
Título:		Protocolo nº 008/2011	
Trichilia catigua: uso cosmético no combate ao envelhecimento cutâneo			
Entrada: 22/9/2011	Início: 1/8/2008	Término: 31/7/2012	
Situação do Projeto:	Aprovado		
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto		
ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .			
Considerações e Parecer: Por entender que os procedimentos experimentais não ferem os princípios éticos na experimentação animal este Comitê é de PARECER FAVORÁVEL à execução do mesmo.			
			
 Prof. Dr. GENTE MONTI DE MORAIS, Presidente em exercício do CEAE			
Artigo 10 da Resolução nº 022/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias: I - aprovado; II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto; III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 90 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação; IV - não aprovado			
www.ppg.uem.br - e-mail: ocea@uem.br			