

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE DE FREITAS NUNES

**SULFATO DE GLUCOSAMINA COMO MODELO DE FÁRMACO HIDROFÍLICO  
EM SISTEMA EMULSIONADO E NANOPARTICULADO PARA APLICAÇÃO  
DERMOCOSMÉTICA**



CURITIBA

2016

FELIPE DE FREITAS NUNES

**SULFATO DE GLUCOSAMINA COMO MODELO DE FÁRMACO HIDROFÍLICO  
EM SISTEMA EMULSIONADO E NANOPARTICULADO PARA APLICAÇÃO  
DERMOCOSMÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria W. Zanin

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josiane de Fátima Gaspari Dias

CURITIBA

2016

Nunes, Felipe de Freitas

Sulfato de glucosamina como modelo de fármaco hidrofílico em sistema emulsionado e nanoparticulado para aplicação dermocosmética / Felipe de Freitas Nunes – Curitiba, 2016.  
108 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Maria W. Zanin

Coorientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Sulfato de glucosamina (D) (2KCl). 2. Emulsão múltipla A1/O/A2. 3. CLAE-UV. I. Zanin, Sandra Maria W. II. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

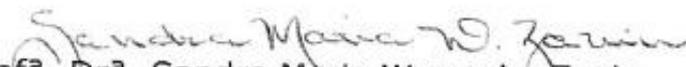
CDD 668.55

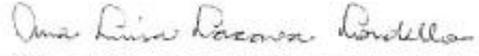
## **TERMO DE APROVAÇÃO**

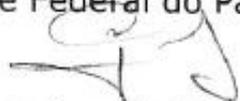
### **FELIPE DE FREITAS NUNES**

**Título: "Sulfato de glucosamina como modelo de fármaco hidrofílico em sistema emulsionado e nanoparticulado para aplicação dermocosmética"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Warumby Zanin  
Orientadora

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Francisco de Assis Marques  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 23 de fevereiro de 2016.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

À minha família, alicerce sem o qual não venceria tantas batalhas.

À minha esposa, Mariani, pelo apoio incondicional, companheirismo, pelo eterno incentivo, pela paciência, dedicação, ajuda, por trazer sentido e felicidade a minha vida e partilhar de um sonho em comum.

Aos meus queridos e amados Pais, Iracema e Jadir, pelo dom da vida, pelos ensinamentos, pela formação que me propiciaram, pelo apoio incondicional, pela ajuda sincera, pelo incentivo constante, pela paciência extremosa e por todo amor compartilhado.

Ao meu irmão André, pelo eterno companheirismo, pelo valioso crescimento ao seu lado.

Aos meus queridos e amados avós, Porfíria, Ignez, Afonso (*in memoriam*) e João (*in memoriam*), pelo exemplo de humildade, luta e dedicação na construção de um futuro melhor para todos, pelo aconchego, ajuda, pelo carinho e pelo amor.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby Zanin, pela grande amizade e orientação, pela confiança em meu trabalho, pelo imensurável aprendizado ao longo do período de mestrado. Ao seu esposo, Pedro Zanin, pela dedicação, comprometimento e parceria incondicional. É por pessoas como vocês que conseguimos acreditar num futuro melhor, e por isso gostaria muito de honrá-los com a minha mais sincera gratidão. Muito obrigado por todas as oportunidades!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Lacava Lordello e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, pelo aceite para a correção e composição da banca de defesa dessa dissertação.

Às Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josiane de Fátima Gáspari Dias e à Marilis Dallarmi Miguel, pelo apoio dado ao meu crescimento profissional.

À aluna de iniciação científica Letícia da Mata Lazinski, pelo grande apoio, colaboração e desenvolvimento do material fotográfico, meu muito obrigado. Também agradeço a aluna de iniciação científica Isabelle Cristhine Silva, pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacotécnica e Fitoquímica em especial à Gislene Mari Fujiwara, pelas dicas e colaboração durante as análises.

Aos meus colegas de trabalho no Grupo Boticário, em especial ao Rodrig Trzaskos, pelo grande apoio e importante parceria no desenvolvimento das metodologias analíticas.

Enfim, dedico este trabalho a todos os meus amigos, colegas e professores que me apoiaram, me auxiliaram e que me proporcionaram a oportunidade de conquistar um sonho.

## RESUMO

As emulsões são de grande interesse para diversas áreas de aplicação, podendo ser empregadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, atuando como veículo para incorporação de componentes ativos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis. Com o do tempo as emulsões tendem a voltar para o seu estado inicial de duas fases, e para que possam ser aplicadas às mais diversas áreas, as emulsões devem apresentar um período de estabilidade físico-química. Dentro deste contexto, estudos relacionados à obtenção e estabilização de emulsões têm viabilizado o desenvolvimento de sistemas cada vez mais complexos como por exemplo, as emulsões múltiplas, que são promissores sistemas carreadores, em que duas emulsões distintas água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A) coexistem simultaneamente em um único sistema água-em-óleo-em-água (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>). Suas aplicações cosméticas potenciais incluem sua utilização na incorporação de materiais incompatíveis e na proteção de componentes ativos dispersos na fase aquosa interna do sistema. O sulfato de glucosamina (D)(2KCl) é um precursor para a biossíntese de ácido hialurônico e estudos com uso oral, demonstraram que proporcionam inúmeros benefícios sobre as células da pele, além dos relacionados às desordens clínicas provenientes da osteoartrite. A viabilização de sua utilização e obtenção de formulações estáveis ainda é um desafio e o objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento e caracterização de um sistema carreador contendo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) em formulação tópica semisólida para uso dermocosmético. A emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> contendo o sulfato de glucosamina (D)(2KCl), obtida a partir do processo de re-emulsificação em duas etapas, permaneceu estável por 30 dias, com a utilização de sistema emulsionante lipofílico e hidrofílico a base de ésteres de sorbitano com EHL 6,44 para estabilizar a emulsão primária A<sub>1</sub>/O, onde foi utilizado óleo mineral. A fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) contendo o componente ativo e sistema tampão cítrico pH 5,0 foi estabelecida para agregar manutenção do equilíbrio osmótico e evitar perda de água e do ativo para a fase aquosa externa (A<sub>2</sub>), composta de tensoativo polimérico anfifílico e goma xantana, aditivo espessante e estabilizante de natureza aniônica. A composição da fase aquosa externa (A<sub>2</sub>) desempenha atividade na adsorção do tensoativo monomérico lipofílico e certo reforço na interface do sistema e na manutenção do equilíbrio osmótico. Com a formulação estabilizada, foi possível visualizar a aplicação do ativo topicamente, visando ação nas camadas mais externas da pele, atuando na hidratação cutânea e na redução de discromias. A metodologia analítica para doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) na formulação utilizou um sistema CLAE-UV (195nm / Eluição Isocrático / 23°C / Coluna C<sub>8</sub> Fase reversa / 20µL de injeção / 0,6mL/min) e mostrou-se adequada para o propósito, com resultado satisfatório, com especificidade (t=3,5min) e linearidade (R<sup>2</sup>= 0,999), podendo dosear o sulfato de glucosamina (D)(2KCl) num intervalo de 0,1 a 4,0% em um sistema emulsionado múltiplo.

Palavras Chave: sulfato de glucosamina (D)(2KCl), emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>, CLAE-UV.

## ABSTRACT

Emulsions are vehicles of great interest for several areas of application and frequently used in the cosmetic, pharmaceutical and food industry, acting as a multifunctional base for incorporating hydrophilic and lipophilic active components. Over time, emulsions tend to revert to the stable state of the two phases comprising the emulsion. Therefore, in order to apply in several areas, the emulsions should have a period of physicochemical stability. In this context, studies related to obtaining and stabilizing emulsions have enabled the development of increasingly complex systems such as multiple emulsions that are promising carrier systems, in which two distinct emulsions, water-in-oil (W/O) and oil-in-water (O/W) simultaneously coexist in a single system water-in-oil-in-water ( $W_1/O/W_2$ ). Potential cosmetic applications include their use in incorporation of incompatible materials and protection of active components dispersed in the internal aqueous phase of the system. Glucosamine sulfate (D)(2KCl) is a precursor for the biosynthesis of hyaluronic acid and oral studies demonstrated that provides numerous benefits over the skin cells, besides the clinical disorders related to osteoarthritis. The feasibility of its use and obtainment of stable formulations is still a challenge and the objective of this research was the development and characterization of a carrier system containing glucosamine sulfate (D) (2KCl) in semi-solid topical formulation for dermocosmetic use. Multiple emulsion  $W_1/O/W_2$  containing glucosamine sulfate (D)(2KCl), obtained from the re-emulsification process in two steps, remained stable for 30 days, with using of lipophilic and hydrophilic emulsifier system based sorbitan esters with a HLB 6.44 to stabilize the primary emulsion  $W_1/O$ , which was used mineral oil. The internal aqueous phase ( $W_1$ ) containing the active component and a citrate buffer system (pH 5.0) was established to aggregate maintenance of osmotic balance and avoid the loss of water and active component to the external aqueous phase ( $W_2$ ), composed by amphiphilic polymeric surfactant and xanthan gum, thickener additive and is an stabilizer of anionic nature. The external aqueous phase composition ( $W_2$ ) has played an activity in the adsorption of monomeric lipophilic surfactant and promoted some strengthening in the system interface and maintenance of osmotic balance. With the stabilized formulation, it was possible to verify the topically application, aiming action in the outer layers of the skin, acting in the skin hydration and dischromias reduction. A simple, specific, sensitive, and rapid high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of glucosamine sulfate (D)(2KCl) for assay was developed. Glucosamine sulfate (D)(2KCl) was baseline separated and quantitated on  $C_8$  reversed phase column, using a mobile phase composed of a phosphate buffer-acetonitrile (55:45v/v, pH 3.0) delivered at a flow rate of 0.6mL/min, and with UV detection (195nm). The method was proven to be linear over a Glucosamine concentration range of 0,1 to 4,0% in a multiple emulsion  $W_1/O/W_2$ , with a mean correlation coefficient of 0.9999 and specificity in 3,5 minutes.

Keywords: glucosamine sulfate (D)(2KCl), multiple emulsion  $W_1/O/W_2$ , High performance liquid chromatography (HPLC)

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A <sub>1</sub>	–	Fase aquosa interna
A <sub>2</sub>	–	Fase aquosa externa
AH	–	Ácido Hialurônico
A/O	–	Emulsão água em óleo
A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub>	–	Emulsão Múltipla água-em-óleo-em-água
°C	–	Graus Celsius
C	–	Carbono
Ca <sup>+2</sup>	–	Íon cálcio
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
COOH	–	Grupamento Carboxílico
DL <sub>50</sub>	–	Dose letal mediana
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
EHL	–	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
g	–	Gramas
g.mol <sup>-1</sup>	–	Gramas por mol
GAGs	–	Glucosaminoglicanas
H	–	Hidrogênio
KCl	–	Cloreto de potássio
Kg	–	Quilograma
mg	–	Miligrama
mL	–	Mililitros
MO	–	Microscópio Óptico
mm	–	Milímetros
m/v	–	massa/volume
μ	–	Micro
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
NAG	–	N-acetil-glucosamina
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	–	Íon amônio
nm	–	Nanômetros

O	–	Oxigênio
O/A	–	Emulsão óleo em água
O <sub>1</sub> /A/O <sub>2</sub>	–	Emulsão Múltipla óleo-em-água-em-óleo
OH <sup>-</sup>	–	Íon Hidroxila
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
®	–	Marca Registrada
RPM	–	Rotações por minuto
UV	–	Ultravioleta

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b>	ANALISADOR DE TAMANHO DE PARTÍCULA COM DIFRAÇÃO DE RAIO LASER BECKMAN COULTER, MODELO LS13220.....	27
<b>FIGURA 2.</b>	ESTRUTURA QUÍMICA DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl).....	50
<b>FIGURA 3.</b>	EMULSÕES PRIMÁRIAS A1/O ANALISADAS APÓS PREPARAÇÃO.....	70
<b>FIGURA 4.</b>	EMULSÕES PRIMÁRIAS A1/O ANALISADAS APÓS PREPARAÇÃO SOB MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 100x).....	71
<b>FIGURA 5.</b>	ESTABILIDADE DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS A1/O (ÁGUA / ÓLEO MINERAL) COM EHL DISTINTOS UTILIZANDO SPAN 80® (EHL 4,3) E TWEEN 80® (EHL 15,0) EM DIFERENTES PROPORÇÕES, OBSERVADAS LOGO APÓS O PREPARO.....	74
<b>FIGURA 6.</b>	EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) 20 DIAS APÓS O PREPARO, COM ASPECTO HOMOGÊNEO E SEM SEPARAÇÃO DE FASES.....	75
<b>FIGURA 7.</b>	EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl), AO MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 200X), 20 DIAS APÓS O PREPARO.....	76
<b>FIGURA 8.</b>	MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 20X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) (a) E NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO (b).....	77
<b>FIGURA 9.</b>	MICROSCOPIA OPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) E TAMPÃO CITRATO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA (A1), APÓS 24 HORAS.....	83
<b>FIGURA 10.</b>	MICROSCOPIA OPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) E AUSÊNCIA DE TAMPÃO CITRATO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA (A1), APÓS 24 HORAS.....	83

<b>FIGURA 11.</b>	MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D) (2KCI) E AUSÊNCIA DE TAMPÃO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA (A1), APÓS 15 DIAS DE PREPARO).....84
<b>FIGURA 12.</b>	MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) E TAMPÃO CITRATO pH 5 NA FASE AQUOSA INTERNA A1, APÓS 15 DIAS DE PREPARO.....85
<b>FIGURA 13.</b>	CURVA DE CALIBRAÇÃO COM TRÊS CONCENTRAÇÕES (A) E DE SETE CONCENTRAÇÕES (B) DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI).....87
<b>FIGURA 14.</b>	CROMATOGRAMA COM O PICO DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI), SENDO ESPECÍFICO E DETECTÁVEL NA CURVA DE CALIBRAÇÃO PRELIMINAR.....88
<b>FIGURA 15.</b>	CROMATOGRAMA DE EMULSÃO MÚLTIPLA CONTENDO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) A 2% (m/v).....89
<b>FIGURA 16.</b>	RESULTADO DA CORRIDA CROMATOGRÁFICA DA AMOSTRA DA EMULSÃO MÚLTIPLA COM SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) A 2%.....90

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO CENÁRIO ATUAL DE METODOLOGIAS PARA O DOSEAMENTO DO SULFATO DE GLUCOSAMINA.....	58
<b>TABELA 2.</b>	RELAÇÃO DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS A1/O DESENVOLVIDAS COM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEOS E EMULSIONANTE SPAN 80® (EHL 4,3) EM CONCENTRAÇÃO DE 5% E 10% EM RELAÇÃO A FASE OLEOSA.....	62
<b>TABELA 3.</b>	RELAÇÃO DE EHL DAS EMULSÕES A1/O TESTADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TENSOATIVOS.....	62
<b>TABELA 4.</b>	COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCL) E DE TAMPÃO CITRATO pH 5,0.....	64
<b>TABELA 5.</b>	COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI).....	65
<b>TABELA 6.</b>	COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE TAMPÃO CITRATO pH 5 NA FASE AQUOSA INTERNA (A1) NA EMULSÃO PRIMÁRIA A1/O.....	66
<b>TABELA 7.</b>	COMPARAÇÃO DE TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D) (2KCI).....	78
<b>TABELA 8.</b>	TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) E TAMPÃO CITRATO pH 5,0.....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** COMPARAÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS ENTRE A EMULSÃO MÚLTIPLA NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) (A) E CONTENDO O COMPONENTE ATIVO (B).....79
- GRÁFICO 2.** DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA COM SISTEMA TAMPONADO E SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) A 2% APÓS 15 DIAS DE PREPARO.....86

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>21</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
3.1 EMULSÕES .....	<b>22</b>
3.1.1 Aspectos gerais.....	<b>22</b>
3.1.2 Tensão superficial / interfacial .....	<b>23</b>
3.1.3 Reologia .....	<b>25</b>
3.1.4 Estudo de estabilidade durante o desenvolvimento de emulsões .....	<b>26</b>
3.2 EMULSÕES MÚLTIPLAS.....	<b>27</b>
3.2.1 Controle da estabilidade de emulsões múltiplas A1/O/A2.....	<b>30</b>
3.2.1.1 Presença de eletrólitos .....	<b>31</b>
3.2.1.2 Concentração do componente ativo osmótico.....	<b>32</b>
3.2.1.3 Influência de aditivos estabilizantes .....	<b>34</b>
3.2.1.4 Natureza da fase oleosa.....	<b>37</b>
3.2.1.5 Propriedades dos filmes interfaciais.....	<b>38</b>
3.2.1.6 Relação de volume entre as fases, método de preparo e variáveis de processo.....	<b>41</b>
3.3 PELE E PERMEAÇÃO .....	<b>42</b>
3.3.1 Pele .....	<b>42</b>
3.3.2 Permeação cutânea .....	<b>45</b>
3.4 COMPONENTE ATIVO – SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) .....	<b>47</b>
3.4.1 Aspectos gerais.....	<b>47</b>
3.4.2 Sulfato de Glucosamina (D) (2KCl) .....	<b>50</b>
3.4.3 Doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) .....	<b>57</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
4.1 MATERIAL .....	<b>59</b>
4.1.1. Reagentes .....	<b>59</b>
4.1.2 Equipamentos .....	<b>60</b>
4.2 MÉTODOS .....	<b>61</b>

4.2.1 Análise preliminar da estabilidade das emulsões primárias A1/O preparadas com diferentes óleos e concentração do emulsionante lipofílico Span 80® (EHL 4,3) de 5% e 10% em relação a fase oleosa .....	61
4.2.2 Determinação do valor de EHL adequado para a emulsão primária A1/O utilizando óleo mineral como fase oleosa e os emulsionantes Span 80® (EHL 4,3) e Tween 80® (EHL 15,0) em diferentes concentrações.....	62
4.2.3 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 em processo de duas etapas na ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Tween 80® (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2).....	63
4.2.4 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) e ausência de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Tween 80® (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2) .....	64
4.2.5 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 em processo de duas etapas contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Poloxamer 407® (EHL 22,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2).....	65
4.2.6 Estudo de estabilidade para o desenvolvimento das formulações .....	66
4.2.7 Metodologia para o doseamento do sulfato de glucosamina (D) (2KCl) .....	67
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1 Análise preliminar da estabilidade das emulsões primárias A1/O preparadas com diferentes óleos e concentração do emulsionante lipofílico Span 80® (EHL 4,3) de 5% e 10% em relação a fase oleosa .....	69
5.2. Determinação do valor de EHL adequado para a emulsão primária A1/O utilizando óleo mineral como fase oleosa e os emulsionantes Span 80® (EHL 4,3) e Tween 80® (EHL 15,0) em diferentes concentrações.....	73
5.3 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 em processo de duas etapas na ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Tween 80® (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2).....	75
5.4 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) e ausência de tampão citrato pH 5,0 na fase	

aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Tween 80® (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2) .....	<b>77</b>
5.5 Desenvolvimento da emulsão múltipla A1/O/A2 em processo de duas etapas contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A1) e utilização do emulsionante Poloxamer 407® (EHL 22,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A2) .....	<b>79</b>
5.6 Metodologia para doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) .....	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Emulsões são largamente utilizadas em cosméticos, assim como em preparações farmacêuticas, podendo ser incorporados em suas fases ativos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, dependendo das características físico-químicas e dos efeitos desejados (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Para que possam ser aplicadas às mais diversas áreas, as emulsões devem apresentar um período de estabilidade físico-química. Dentro deste contexto, estudos relacionados à obtenção e estabilização de emulsões têm viabilizado o desenvolvimento de sistemas cada vez mais complexos, como por exemplo, as emulsões múltiplas (ARAUJO, 2013; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Emulsões múltiplas são promissores sistemas carreadores, em que duas emulsões distintas água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A) coexistem simultaneamente em um único sistema, obtidas a partir do processo de re-emulsificação em duas etapas. Devido à estrutura e propriedades, as emulsões múltiplas são de grande interesse para diversas áreas de aplicação, podendo ser empregadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Suas aplicações farmacêuticas potenciais incluem a sua utilização em vacinas e na mobilização de enzimas. Para uso cosmético, podem ser utilizadas na incorporação de materiais incompatíveis e na proteção de ativos por dispersão na fase interna (SCHMIDTS et al., 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

As emulsões múltiplas apresentam muitas vantagens e aplicações promissoras. No entanto, para viabilizar sua utilização e obter formulações estáveis ainda é um desafio e requer criteriosos estudos, tais como a necessidade de utilização de sistemas emulsionantes, compatíveis quimicamente com os componentes da emulsão e com valores de EHL adequados ao sistema, pois são capazes de reduzir a tensão interfacial do sistema e formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase aquosa interna (MCCLEMENTS, 2011; SCHMIDTS et al, 2009; ZANIN et al., 2002; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

A instabilidade destes sistemas emulsionados múltiplos pode ocorrer pelos mecanismos de coalescência e ruptura do filme oleoso entre as fases aquosas

interna e externa, resultando na perda das gotículas aquosas internas. Assim, existem fatores específicos, para o controle da estabilidade de emulsões múltiplas A1/O/A2 que incluem a presença de eletrólitos, concentração do componente ativo osmótico, natureza da fase oleosa, influência de aditivos estabilizantes, relação de volume entre as fases, método de preparo e variáveis de processo (SCHMIDTS et al., 2009; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

Sendo assim para que cosméticos sejam desenvolvidos é fundamental a viabilização do seu uso, contemplando os processos produtivos, a estabilidade e o doseamento do ativo no sistema emulsionado. Exigindo-se assim da ciência cosmética, não apenas a descoberta de novos princípios ativos, como também o aprimoramento das técnicas de preparo das emulsões múltiplas.

A glucosamina é um produto do metabolismo da glucose, produzida pelo próprio organismo humano. É um amino-mono-sacarídeo que aparece em funções bioquímicas essenciais, inibindo a síntese de enzimas proteolíticas e atuando como precursor da síntese do ácido hialurônico, um importante componente estrutural de ligação de água na epiderme e derme, o qual fornece a estrutura para a formação do colágeno, bem como preserva a hidratação e a elasticidade da pele (MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2013; GARNER et al., 2007; JACOBS, 2007; BISSETT, 2006).

No mercado existem três tipos de glucosaminas disponíveis, o cloridrato de glucosamina (retirado da casca de caranguejo), o sulfato de glucosamina (D)(2KCl) (retirada da casca de camarão) e a N-acetil-glucosamina, obtida por derivatização. A maior parte da glucosamina nestes suplementos é um derivado da quitina encontrada em exoesqueletos marinhos (LOPES JÚNIOR; INACIO, 2013).

O cloridrato de glucosamina é considerado mais estável, mas o sulfato de glucosamina pode ter maior eficácia biológica, por também ser um componente da matriz cartilaginosa. O sulfato de glucosamina apresenta-se como um pó cristalino incolor, em forma de agulha, altamente polar, que apresenta determinada carga iônica, é degradado a 110°C, dissolve-se facilmente em água e apresenta peso molecular relativamente baixo de 456,42 g/mol. Apesar da característica hidrofílica, estudos demonstraram taxa de penetração de sulfato de glucosamina adequada na pele, o que torna possível a sugestão de uso tópico do produto e do sistema emulsionado múltiplo como opção de veículo (ERHAN et al., 2012; SOO-YOUL; CHANG-HOON; AI-YOUNG, 2012; GARNER, 2005).

Os ensaios clínicos têm considerado a glucosamina como sendo um modificador da história natural da osteoartrose (KANWISCHER et al., 2005). Embora a maior parte da literatura publicada sobre a glucosamina incida na utilização oral no tratamento e prevenção da artrite e de seus sintomas, existem vários estudos a respeito dos seus efeitos benéficos nas administrações tópicas e orais relacionados à pele.

Devido à estimulação da síntese de ácido hialurônico por queratinócitos humanos, a glucosamina é capaz de acelerar a cicatrização de feridas, melhorar a hidratação da pele e, eventualmente, ser utilizada para tratamento anti-rugas, através da construção da matriz estrutural da pele (BISSETT, 2009; BISSETT, 2006; SAYO; SAKAI; INOUE, 2004).

Investigações científicas têm demonstrado que a glucosamina, bem como seus metabólitos, podem estimular a ligação de água com glucosaminoglicanos (GAGs) por fibroblastos e queratinócitos, proporcionando assim uma base para o seu uso em cosméticos anti-idade (GREEN et al., 2007; OSBORNE; MULLINS; ROBINSON, 2006). Um estudo para o tratamento do envelhecimento cutâneo revelou um aumento de firmeza e elasticidade. Acredita-se que este papel do sulfato de glucosamina é desempenhado devido ao fato de que é um componente essencial dos proteoglicanos, que constituem a estrutura de colágeno e, também, pela retenção de água, aumentando a flexibilidade e resistência à compressão da pele (JACOBS, 2007; GREEN et al., 2004).

A glucosamina também pode ser benéfica em casos de pigmentação excessiva, tais como as manchas de idade, caracterizadas por acúmulo localizado de melanina. A glucosamina atua como um inibidor da ativação da tirosinase, que inibe a produção de melanina, tornando-se útil no tratamento dos distúrbios da hiperpigmentação em geral (BISSETT, 2006).

## 2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica efetiva para doseamento do ativo e caracterização de sistemas carreadores contendo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) em formulação tópica semisólida para uso dermocosmético.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um sistema carreador eficiente para aplicação tópica de sulfato de glucosamina (D) (2KCl).

Caracterizar os parâmetros físico-químicos, estabilidade e eficiência de encapsulamento das formulações desenvolvidas.

Desenvolver uma metodologia analítica para doseamento do ativo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EMULSÕES

##### 3.1.1 Aspectos gerais

Emulsões são definidas como sistemas termodinamicamente instáveis, resultantes da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si, denominados de fase aquosa e oleosa. Podem ser classificadas em emulsões do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), de acordo com o caráter hidrofílico ou lipofílico da fase dispersante externa. São largamente utilizadas em cosméticos, assim como em preparações farmacêuticas, podendo ser incorporados em suas fases componentes ativos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, dependendo das características físico-químicas e dos efeitos desejados (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; PAULA, 2015; LAM; NICKERSON, 2013; MCCLEMENTS, 2011; MORAIS, 2008; PIANOVSKI et al., 2008; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Para que possam ser aplicadas às mais diversas áreas, as emulsões devem apresentar um período de estabilidade físico-química. Dentro deste contexto, existem substâncias que, ao serem adicionadas na emulsão, promovem o aumento do tempo de estabilidade e que são conhecidas como agentes emulsionantes ou tensoativos. Estes agentes são capazes de reduzir a tensão interfacial por formar um filme com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna, devido à suas características anfifílicas. Por apresentar uma parte polar hidrofílica e uma parte apolar lipofílica, favorecem a estabilização termodinâmica do sistema (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; LAM; NICKERSON, 2013; ARAUJO, 2013; MCCLEMENTS, 2011; MORAIS, 2008; MORAIS, 2006; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

A escolha dos agentes emulsionantes precisa ser convenientemente equilibrada para o preparo das emulsões. Ao longo dos anos alguns métodos empíricos e experimentais foram desenvolvidos, dentre os quais se destacou o

sistema de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), que representa o balanço entre os grupos polares e apolares, traduzindo as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um composto anfifílico em uma escala numérica, na qual tensoativos hidrofílicos geralmente possuem valores de EHL  $\geq$  a 7,0 e os lipofílicos  $\leq$  a 7,0 (RISSI, 2013; FRANGE; GARCIA, 2009; MORAIS, 2008; MORAIS, 2006; ZANIN et al., 2002; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

O desafio da estabilização é decorrente de processos de modificações após a preparação. Excluindo as alterações de ordem microbiana, a instabilidade de uma emulsão pode se manifestar na forma de cremosidade, onde as partículas menos densas permanecem na superfície da formulação; floculação, onde a força de repulsão entre as moléculas é diminuída, havendo associação de maneira fraca e reversível por agitação; coalescência, onde as gotículas da fase interna se unem irreversivelmente e formam uma outra gotícula; e quando ocorre a inversão de fases, onde a fase externa torna-se interna ou vice-versa (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; MCCLEMENTS, 2011; ANDRADE, 2008; PIANOVSKI et al., 2008; MORAIS, 2008; MORAIS, 2006; ZANIN et al., 2002; MORRISON; ROSS, 2002; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

### 3.1.2 Tensão superficial / interfacial

A interface é uma região termodinamicamente instável de dimensão finita, com moléculas em constante movimento. A tensão superficial ou interfacial pode ser descrita como uma associação de forças coesivas assimétricas, responsáveis pela tensão na superfície de um líquido ou na interface entre dois líquidos de polaridades distintas, como as fases aquosa e oleosa em uma emulsão (PAIVA, 2011; KHAN et al., 2011; PICHOT, 2010; TADROS, 2009; MORAIS, 2008; OPAWALE; BURGESS, 1998; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986).

A tensão superficial pode ser definida como a energia ou força necessária que deve ser aplicada em uma determinada superfície, em Newton/m, a fim de equilibrar a força proveniente do interior do sistema. Em geral, a tensão superficial de um líquido com o ar é maior do que a tensão interfacial entre dois líquidos,

porque a relação de força de adesão na interface líquido-líquido é superior à força existente na interface líquido-gás. Outro ponto relevante que se observa ao se desenvolver emulsões é a diminuição linear da tensão superficial com o aumento da temperatura, gerando em temperatura crítica, forças coesivas intermoleculares tendendo a zero (GHOSH, 2014; MORAIS, 2008; OPAWALE; BURGESS, 1998; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986).

A adição de tensoativos em uma emulsão promove alterações relevantes nos valores de tensão superficial, reduzindo-a consideravelmente, de acordo com a equação de Gibbs, devido à formação de uma camada adsorvida na região de interface óleo/água, até alcançar a concentração micelar crítica (CMC). A partir deste ponto, a adição dos tensoativos não promove alterações relevantes sobre os valores de tensão superficial, ocorrendo a formação de agregados na fase aquosa, denominados micelas. A camada interfacial formada só é possível porque os agentes tensoativos apresentam característica tanto lipofílica quanto hidrofílica, interagindo assim simultaneamente com as duas fases da emulsão (MORAIS, 2008; OPAWALE; BURGESS, 1998; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986).

A eficiência da formação do filme interfacial é um fator importante em emulsões, pois confere uma relação direta entre tensão superficial em função do tempo, ou seja, quanto mais rapidamente se atinge o mínimo de tensão superficial maior será a velocidade de formação do filme interfacial e com isto previne-se fenômenos indesejados como, por exemplo, a coalescência (MORAIS, 2008; YARRANTON; SZTUKOWSKI; URRUTIA, 2007; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986).

Sendo assim, o foco da utilização de tensoativos no preparo de emulsões está relacionado à redução na tensão interfacial que promove a formação de partículas menores e mais homogêneas, durante o processo de emulsificação, promovendo assim, uma maior estabilidade cinética (MORAIS, 2008; OPAWALE; BURGESS, 1998).

### 3.1.3 Reologia

A reologia é a ciência que estuda as propriedades mecânicas de escoamento e deformação de materiais, sendo fundamental para a obtenção de informações da estabilidade física e consistência de emulsões. Os diferentes processos que ocorrem na emulsão como coalescência, floculação, cremação, inversão de fases, maturação de Ostwald e sedimentação podem ser investigados através das análises reológicas. Sendo assim, o estudo das propriedades reológicas é uma etapa essencial no desenvolvimento de produtos cosméticos que, além das informações de estabilidade, permite a correlação com a avaliação sensorial dos consumidores (COUTO, 2014; TEIXEIRA, 2014; TADROS, 2009; MORAIS, 2008; PIANOVSKI et al., 2008).

As medidas das propriedades de fluxo podem ser divididas em comportamento linear e não-linear. As propriedades não-lineares dependem da tensão de cisalhamento, determinada através da força pela área, e da taxa de cisalhamento aplicada, que é o gradiente de velocidade de fluxo produzido pela tensão de cisalhamento, possibilitando avaliar as variações na viscosidade do sistema. A viscosidade pode ser definida como a medida de fricção interna de um fluido, isto é, a resistência encontrada pelas moléculas em se moverem no interior de um líquido, devido ao movimento Browniano e às forças intermoleculares (COUTO, 2014; TEIXEIRA, 2014; MORAIS, 2008).

De acordo com o comportamento reológico os fluidos são classificados em Newtonianos e não-Newtonianos. Os fluidos newtonianos exibem proporcionalidade entre a taxa e a tensão de cisalhamento, e a viscosidade é independente da taxa de cisalhamento a uma determinada temperatura. Por outro lado, os fluidos que não apresentam esse comportamento de tensão e taxa de cisalhamento proporcionais, são classificados como não-Newtonianos. Neste tipo de fluido a viscosidade depende da taxa de cisalhamento aplicada, sendo assim é possível observar diferentes valores de viscosidade em uma mesma amostra. Sistemas emulsionados cosméticos são exemplos deste perfil reológico (TEIXEIRA, 2014; COUTO, 2014; TADROS, 2009; MORAIS, 2008).

Outro estudo reológico existente é o oscilatório ou dinâmico, que estuda a resposta de superfícies e interfaces móveis à deformação. A estabilidade de emulsões está diretamente relacionada à resistência do filme interfacial. Como ponto de atenção, na região de formação do filme interfacial de tensoativos nas emulsões, pode se observar a criação de um gradiente de tensão interfacial, à medida em que ocorre concentrações não uniformes de tensoativos na interface (TEIXEIRA, 2014; MORAIS, 2008; OPAWALE; BURGESS, 1998).

Na estabilidade geral dos sistemas emulsionados, a resistência da barreira mecânica formada pelos tensoativos é mais relevante do que a tensão interfacial resultante. Em emulsões múltiplas um dos principais fatores para a estabilização é a resistência dos filmes interfaciais formados (MORAIS, 2008).

#### 3.1.4 Estudo de estabilidade durante o desenvolvimento de emulsões

Os estudos de estabilidade durante o desenvolvimento de emulsões são realizados de acordo com os testes pré-estabelecidos na literatura – Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. A avaliação macroscópica da formulação, tais como homogeneidade e características organolépticas, determina inicialmente a estabilidade das amostras preparadas, após um período de 24 horas. Para as amostras macroscopicamente estáveis, se realiza testes organolépticos e microscópicos nos dias 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> (ANDRADE, 2008; MORAIS, 2006; BRASIL, 2004).

Os parâmetros que geralmente são avaliados são definidos pelo formulador de acordo com características intrínsecas e específicas da formulação em estudo e dos componentes utilizados na formulação. Em geral, se avaliam as características organolépticas, tais como aspecto, cor e odor, e as características físico-químicas, tais como tamanho e distribuição das partículas, viscosidade, densidade e teor de ativos. Os ensaios organolépticos fornecem parâmetros que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra a amostra em estudo por meio de análises comparativas, com o objetivo de verificar alterações como separação de fases,

precipitação e turvação, utilizando uma amostra padrão de referência (MORAIS, 2006; BRASIL, 2004).

Por sua vez, os ensaios físico-químicos são avaliações quantitativas que também diagnosticam alterações nas amostras testadas. A análise do perfil da curva de distribuição de partículas, durante o período de estabilidade, permite acompanhar o comportamento microscópico das partículas em suspensão evidenciando fenômenos de instabilidade. A avaliação de tamanho e distribuição das partículas pode ser realizada através da metodologia de difração de raio laser, como pode ser observado na Figura 1. Como metodologia, o equipamento determina a distribuição granulométrica de uma amostra pela técnica de difração de raio laser. A difração é definida como sendo um fenômeno físico que ocorre com as ondas eletromagnéticas quando estas passam por um orifício ou contornam um objeto cuja dimensão é da mesma ordem de grandeza que o seu comprimento de onda (BECKMAN, 2016).

FIGURA 1 - ANALISADOR DE TAMANHO DE PARTÍCULA COM DIFRAÇÃO DE RAIO LASER  
BECKMAN COULTER, MODELO LS13220



FONTE: O Autor (2015).

Paralelamente, a análise microscópica permite o registro das características da formulação, como a formação de glóbulos e homogeneidade da emulsão (ANDRADE, 2008; MORAIS, 2006; BRASIL, 2004).

### 3.2 EMULSÕES MÚLTIPLAS

Emulsões múltiplas são definidas como sistemas carreadores complexos, em que duas emulsões distintas água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A)

coexistem simultaneamente em um único sistema. Os tipos mais comuns são água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) ou óleo-em-água-em-óleo ( $O_1/A/O_2$ ) (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN KUMAR, 2012; AKHTAR et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2010; MORAIS, 2008; COLE; WHATELEY, 1997).

O método de obtenção mais utilizado é o processo de re-emulsificação em duas etapas, onde inicialmente se prepara a emulsão primária ( $A_1/O$ ), emulsionando-a posteriormente em água para formar a emulsão múltipla ( $A_1/O/A_2$ ). As fases aquosas interna e externa estão separadas por uma camada de óleo e, devido a baixa estabilidade termodinâmica, requerem pelo menos dois agentes emulsionantes, um com característica lipofílica (EHL baixo), como por exemplo o monooleato de sorbitano - Span 80<sup>®</sup>, para formação da emulsão primária, e outro com característica hidrofílica (EHL alto), como por exemplo o polioxietileno (20) monooleato de sorbitano - Tween 80<sup>®</sup>, para atingir a emulsificação secundária e formar a emulsão múltipla, estabilizando o sistema (AGRAWAL; KULKARNI; SHARMA, 2015; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; SCHMIDT et al., 2015; AMID; MIRHOSSEINI, 2014; KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN KUMAR, 2012; AKHTAR et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2009; MORAIS, 2008; CARLOTTI et al., 2005; COLE; WHATELEY, 1997; COLE; WHATELEY, 1995; OMOTOSHO, 1990; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

A estrutura dos glóbulos múltiplos  $A_1/O/A_2$  é dependente da natureza do emulsionante. Estudos têm demonstrado que é possível preparar três tipos diferentes de emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$ , a partir de três emulsões base compostas de água-miristato de isopropila-água, preparadas com três emulsionantes hidrofílicos distintos, Brij 30<sup>®</sup> (Polioxietileno lauril éter), Triton X-165<sup>®</sup> (Octilfenol etoxilado) e sistema Span 80<sup>®</sup> (Monooleato de sorbitano) e Tween 80<sup>®</sup> (Polioxietileno (20) monooleato de sorbitano) na proporção (3:1). Verificou-se um caráter significativamente diferente entre as emulsões. Foi evidenciado pequenos glóbulos múltiplos (diâmetro médio de 8,6 $\mu$ m) com apenas uma gota aquosa interna na emulsão contendo Brij 30<sup>®</sup>. Já na emulsão contendo Triton X-165<sup>®</sup> o sistema apresentou glóbulos múltiplos maiores (diâmetro médio de 19 $\mu$ m), contendo pequenas, porém numerosas gotículas aquosas internas. E no caso da emulsão com sistema Span 80<sup>®</sup>: Tween 80<sup>®</sup> apresentou glóbulos múltiplos muito grandes (diâmetro médio de 25 $\mu$ m), com um grande número de gotículas internas. Sendo

assim foi possível determinar que a estrutura do glóbulo múltiplo provavelmente depende da segunda etapa de emulsificação (FLORENCE; WHITEHILL, 1982; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

Devido à complexidade das emulsões múltiplas criou-se um sistema de nomenclatura para caracterizar as fases constituintes do sistema. Por exemplo, a emulsão  $A_1/O/A_2$  pode ser descrita pela formação de duas interfaces, em que a fase aquosa  $A_1$  é dispersa na fase oleosa (O) formando a emulsão primária  $A_1/O$ . A emulsão  $A_1/O$  então é redispersa na fase aquosa externa ( $A_2$ ), formando a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Historicamente os primeiros relatos a respeito do desenvolvimento de emulsões múltiplas provêm de 1965, em que foi desenvolvida uma emulsão múltipla como um novo sistema de liberação de componentes ativos (COLE; WHATELEY, 1997; HERBERT, 1965).

Por sua vez, Engel, Riggi e Fahrenbach (1968) investigaram o possível uso de emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  para facilitar a absorção gastrointestinal de biopolímeros solúveis em água, normalmente não absorvíveis. Shichiri e colaboradores (1975) demonstraram que ratos com diabetes induzida apresentaram redução significativa nos níveis de glicose na urina, com a administração de emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  de insulina.

Atualmente, devido à estrutura e propriedades, as emulsões múltiplas são de grande interesse para diversas áreas de aplicação, podendo ser empregadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, atuando na veiculação de componentes ativos com liberação controlada, bem como na encapsulação de substâncias para mascarar o sabor desagradável e proteger de processos de degradação. Suas aplicações farmacêuticas potenciais incluem a utilização em vacinas e mobilização de enzimas. Para uso cosmético, podem ser utilizadas na incorporação de materiais incompatíveis e na proteção de ativos por dispersão na fase interna, como por exemplo a vitamina C. Existem relatos de utilizações não farmacêuticas, na separação de hidrocarbonetos (SCHMIDT et al., 2015; MAHMOOD et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARÍN; LOBATO-CALLEROS; VERNON-CARTER, 2013; SIGWARD et al., 2013; KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011; AKHTAR et al., 2010; LOBATO-CALLEROS et al., 2008; COLE; WHATELEY, 1997; COLE; WHATELEY, 1995; OMOTOSHO,

1990).

Assim, as emulsões múltiplas apresentam muitas vantagens e aplicações, porém, obter formulações estáveis ainda é um desafio. A necessidade de utilização de grandes quantidades de emulsionantes dificulta a formulação de emulsões em grau farmacêutico, motivo pelo qual existem poucas emulsões múltiplas farmacêuticas no mercado (MAHMOOD; AKHTAR; MANICKAM, 2014; SCHMIDTS et al, 2009).

### 3.2.1 Controle da estabilidade de emulsões múltiplas $A_1/O/A_2$

As emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) devido à complexidade de sua estrutura não são sistemas estáveis. Assim, há a necessidade de avaliar os fatores que causam a desestabilização para que se possa preparar estes produtos com estabilidade adequada para possível comercialização (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; CARLOTTI et al., 2005; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

A instabilidade destes sistemas emulsionados múltiplos pode ocorrer pelos mecanismos de (i) coalescência das gotículas de água na fase  $A_1/O$  (AKHTAR et al., 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1981); (ii) coalescência dos glóbulos de óleo na emulsão  $A_1/O/A_2$  (AKHTAR et al., 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1981); (iii) ruptura do filme oleoso entre as fases aquosas interna e externa, resultando na perda das gotículas aquosas internas (AKHTAR et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2009; FLORENCE; WHITEHILL, 1981); (iv) passagem da água bem como de fármacos, ativos ou aditivos solúveis na água através da camada de óleo entre as fases aquosas interna e externa do sistema múltiplo (SCHMIDTS et al. 2009; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

Os fatores específicos para o controle da estabilidade de emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  incluem:

### 3.2.1.1 Presença de eletrólitos

A presença de eletrólitos parece ser um dos mais importantes fatores que determinam a estabilidade e a liberação de componentes ativos ou aditivos das gotículas internas das emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$ . Isto ocorre através do balanço da pressão osmótica entre as fases aquosas interna ( $A_1$ ) e externa ( $A_2$ ) ou, pela formação de uma camada interfacial rígida entre a fase oleosa e a fase aquosa interna ( $A_1$ ) do sistema múltiplo (AKHTAR et al., 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Os efeitos dos eletrólitos acontecem de duas maneiras: (i) osmótico, peculiar aos sistemas múltiplos e (ii) interfacial (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Considerando os efeitos osmóticos que podem ocorrer nos sistemas múltiplos considera-se que as moléculas de água tanto quanto componentes solúveis na água possam passar de uma fase aquosa para a outra através da fase oleosa que atua como uma membrana semipermeável que é muitas vezes referida como fase de membrana ou fase membrana (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Se a pressão osmótica é maior na fase aquosa interna ( $A_1$ ), a água pode passar para esta fase resultando em dilatação das gotículas internas que eventualmente rompem, liberando o conteúdo. O reverso é verdadeiro se a pressão osmótica é maior na fase aquosa externa ( $A_2$ ), resultando em transferência de água da fase aquosa interna para a externa causando contração das gotículas internas (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Se a diferença de pressão osmótica através da camada oleosa é extrema, então a passagem de água é tão rápida que quase imediatamente ocorre ruptura dos glóbulos de óleo com expulsão das gotículas internas. Este fato ocorre com frequência onde a camada de óleo é fina. Outras substâncias que não eletrólitos, como proteínas, açúcares e fármacos podem também exercer este efeito (AKHTAR et al., 2010; SCHMIDTS et al., 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Quando a camada de óleo rompe, a fase aquosa interna em gotícula desaparece instantaneamente, seguido pela mistura da fase aquosa interna com o meio aquoso externo e permanecendo no sistema um simples glóbulo de óleo (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Em relação aos efeitos interfaciais foi observado que fatores outros que gradientes osmóticos afetam a passagem do fármaco. Foi sugerido que o cloreto de sódio (NaCl) compete com o emulsionante pelas moléculas de água na interface interna A<sub>1</sub>/O, o que resultaria em uma camada interfacial rígida que poderia atuar como uma barreira mecânica mais efetiva para a transferência do fármaco (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Em trabalho de Schmidts e colaboradores (2010) foi constatado que as diferenças entre emulsões contendo NaCl e sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) são devidas a diferentes interações dos íons Na<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> com os emulsionantes. Observou-se que os eletrólitos influenciam as propriedades dos emulsionantes pelo efeito da solubilização por salificação (*salting in*) ou pela diminuição da solubilização por salificação (*salting out*). Os cátions bivalentes, tais como o Mg<sup>2+</sup>, *salt-in* os emulsionantes não iônicos polietoxilados por complexação dos cátions com o átomo de oxigênio do éter. Por outro lado, os cátions monovalentes como o Na<sup>+</sup> *salt-out* os emulsionantes pois competem pela água de hidratação na parte polar do emulsionante, isto é, promovem a desidratação das cadeias de polioxietileno, diminuindo a sua solubilidade, o que desestabiliza energeticamente a emulsão.

Em emulsões contendo Steareth-20<sup>®</sup> como emulsionante, as propriedades de *salting-in* dos íons magnésio mostraram um efeito positivo na estabilidade da emulsão em comparação a outros aditivos por um período de 6 meses de armazenamento. Os sistemas mostraram estabilidade adequada pois não ocorreu nem separação nem inversão de fases. A utilização do MgSO<sub>4</sub> na fase aquosa interna forneceu viscosidade estável aos sistemas emulsionados ao longo do tempo (SCHMIDTS et al., 2010).

### 3.2.1.2 Concentração do componente ativo osmótico

A estabilização depende da concentração escolhida do componente ativo osmótico, previamente acrescentado à fase aquosa interna do sistema. Existem diversos fatores que podem influenciar a migração dos componentes ativos osmóticos, como o coeficiente de partição, ionização, densidade de carga, peso

molecular e mobilidade molecular. Para se obter uma formulação estável, a concentração de eletrólitos tem que ser alta o suficiente para regular a pressão de Laplace mas ao mesmo tempo suficientemente baixa para evitar os efeitos osmóticos. Assim, o balanço da pressão osmótica pode ser explicado pela neutralização da pressão de Laplace que está associada à curvatura da superfície do glóbulo. Isto resulta em decréscimo no mecanismo de maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*) nas emulsões, que são usualmente polidispersas. Os glóbulos menores terão solubilidade maior quando comparados aos maiores, devido a maior curvatura interfacial. Com o tempo, os glóbulos menores tendem a desaparecer e suas moléculas difundem para a fase dispersante depositando nos glóbulos maiores e acarretando variação na distribuição de tamanho a valores maiores (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; SCHMIDTS et al., 2010; MORAIS, 2008).

Existem diversos mecanismos possíveis por meio dos quais as substâncias podem ser transferidas através da camada oleosa em um sistema  $A_1/O/A_2$ . Dois mecanismos são sugeridos para a possível permeação de água e ativos ionizados através da fase oleosa nestes sistemas emulsionados: (i) por transporte em micelas mistas e inversas de emulsionantes hidrofóbicos e hidrofílicos e (ii) as moléculas de água podem difundir através de lamelas muito finas de emulsionantes formadas onde a camada oleosa é muito fina. Foi sugerido que estes mecanismos provavelmente ocorrem quando existe uma diferença de pressão osmótica entre as duas fases aquosas (SCHMIDTS et al., 2009; FLORENCE; WHITEHILL, 1982; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

Para substâncias não ionizadas solúveis em lipídios a difusão no óleo parece ser o mecanismo mais importante de transporte em sistemas múltiplos. Este mecanismo é dependente da natureza da substância, incluindo sua constante de dissociação, a natureza do óleo e o pH da fase aquosa (AKHTAR et al, 2010; FLORENCE; WHITEHILL, 1982; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

### 3.2.1.3 Influência de aditivos estabilizantes

O maior problema associado às emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  é a cremação, mecanismo que ocorre provavelmente devido ao tamanho grande das gotículas múltiplas. Pode-se reduzir a cremação pelo aumento da concentração do emulsionante secundário no sistema, contudo, pode acarretar toxicidade e diminuição na liberação do ativo (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Alguns aditivos estabilizantes podem ser acrescentados às emulsões múltiplas para aumentar a sua estabilidade. Estes componentes incluem os agentes gelificantes ou de aumento de viscosidade que são acrescentados às fases aquosas interna ou externa do sistema e incluem gelatina, metilcelulose e agentes espessantes similares (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012).

Um produto bastante utilizado como aditivo espessante é a goma xantana, um polissacarídeo de alto peso molecular (200.000 Da). Contém D-glucose, D-manose e ácido glucurônico em sua estrutura química e é classificada como sendo um biopolímero de cadeia ramificada e aniônica. Dentre as propriedades atua como espessante e estabilizante. Possui elevada viscosidade em baixas concentrações. Soluções aquosas são estáveis em ampla faixa de pH (pH 3 – 12), com estabilidade máxima em pH 4 – 10 e temperatura de 10 – 60°C. Suas soluções são também estáveis na presença de enzimas, sais, ácidos e bases. A goma xantana, por ser um material aniônico não é normalmente compatível com emulsionantes catiônicos, polímeros, ou conservantes, quando ocorre precipitação. Emulsionantes aniônicos e anfotéricos em concentração acima de 15% (m/v) causam precipitação da goma xantana em solução (SCARIOTTO, 2013; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; TONELI; MURR; PARK, 2005). Possui compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos. O caráter iônico nas moléculas de goma xantana aumenta a sua hidratação (AMID; MIRHOSSEINI, 2014).

O efeito da incorporação de aditivos espessantes na fase aquosa interna da emulsão pode ser atribuído a formação de um filme polimérico rígido ou complexo macromolecular através das interfaces óleo/água, ou seja, através de interação interfacial entre macromoléculas na fase aquosa interna e o emulsionante lipofílico não iônico na fase oleosa do sistema. Este filme atua protegendo os glóbulos da

coalescência e aumentando a estabilidade do sistema a longo prazo (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; SCHMIDTS et al., 2010; OMOTOSHO, 1990).

O uso de um agente espessante como o álcool polivinílico na fase aquosa externa pode reduzir a cremação, mas deve-se ficar atento que a emulsão retenha suas características reológicas (FLORENCE; WHITEHILL, 1982). Também podem ser utilizados agentes complexantes que conduzem à formação de fases cristalinas líquidas na interface O/A<sub>2</sub>, como o álcool cetílico e, agentes gelificantes para a fase oleosa como o monoestearato de alumínio (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Trabalhos prévios de Omotosho e colaboradores (1986) relataram a estabilização de emulsões múltiplas A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> através de interação interfacial entre albumina sérica bovina na fase aquosa interna A<sub>1</sub> e monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) na fase oleosa. Pode-se observar o complexo interfacial pela formação de um filme visível na interface óleo/água e pelo aumento da estabilidade do sistema múltiplo contendo como aditivo osmoticamente ativo o cloreto de sódio (NaCl).

Em outro trabalho de Omotosho (1990) foram avaliadas emulsões múltiplas contendo fosfato de cloroquina na fase interna do sistema estabilizado por interação interfacial entre monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) e as macromoléculas acácia, gelatina e polivinilpirrolidona. Os glóbulos de óleo múltiplos variaram em tamanho dependendo de qual macromolécula estava presente na fase interna, com diâmetro médio de 27,3 µm para a polivinilpirrolidona; 36,7 µm para a acácia; 44,8 µm para a gelatina. Apesar de diferenças entre as macromoléculas na estabilidade da emulsão, estes sistemas forneceram emulsões mais estáveis do que as preparadas com Span 80<sup>®</sup> livre como emulsionante primário. Quanto à liberação do fosfato de cloroquina as diferenças observadas podem ser devidas ao tamanho da gotícula da fase aquosa interna e da força mecânica do filme interfacial na interface A<sub>1</sub>/O. As emulsões múltiplas armazenadas por duas semanas mostraram um índice de liberação mais baixo de fosfato cloroquina quando comparadas àquelas recém preparadas. Pode-se atribuir a dois fatores estes resultados. Primeiro, que o filme interfacial resultante da interação entre Span 80<sup>®</sup> e a macromolécula torna-se mais rígido com o tempo, assim formando uma barreira mais eficiente contra o transporte do fosfato de cloroquina encapsulado. Segundo, a coalescência entre as gotículas, que poderia conduzir a um aumento no tamanho do glóbulo, redução da área

interfacial disponível para o transporte do fármaco e redução no índice de liberação do fosfato de cloroquina. Contudo, não ocorreu aumento significativo no tamanho médio dos glóbulos, sugerindo que o fosfato de cloroquina é liberado do sistema por processo de difusão através da membrana líquida oleosa e não por quebra da emulsão.

Em trabalho de Schmidts e colaboradores (2010) dois diferentes derivados da celulose, a hidroxietilcelulose e a sódio-carboximetilcelulose, foram incorporados na fase aquosa interna do sistema múltiplo  $A_1/O/A_2$ . A maioria dos derivados da celulose dissolve em água fria e são principalmente usados para o controle da viscosidade por gelificação. Como resultado, a adição do espessante na fase aquosa interna não afetou as propriedades físicas da emulsão primária  $A_1/O$  subsequente à produção. Utilizando diferentes emulsionantes não iônicos polietoxilados observou-se diferenças nas interações entre os derivados da celulose e os grupos químicos dos emulsionantes, como grupos éster e éter, possibilitando ou não a formação do sistema múltiplo. A adição destes derivados da celulose resultou em decréscimo na separação de fases nas formulações testadas, mas pouco interferiu nas propriedades físico-químicas das emulsões múltiplas e nem na liberação dos eletrólitos encapsulados.

Em trabalho de Cole e Whateley (1995) foram desenvolvidos complexos entre emulsionantes hidrofílicos Pluronic<sup>®</sup> (Poloxamer<sup>®</sup>) e ácido poli-acrílico {(PAA), Carbopol 907<sup>®</sup>} que possam interagir com o emulsionante lipofílico e aumentar a estabilidade de emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$ . As emulsões foram preparadas pelo processo em duas etapas e a fase aquosa de cada emulsão primária  $A_1/O$  continha solução do complexo Pluronic<sup>®</sup>:PAA, que reúne as propriedades de um polieletrólito (PAA) e um emulsionante hidrofílico polimérico (Pluronic<sup>®</sup>) na mesma molécula. A estabilidade das emulsões preparadas com estes complexos, que possuem propriedades bioadesivas, possui relação aos tamanhos das partículas dos complexos Pluronic<sup>®</sup>:PAA e do tipo de emulsionante lipofílico utilizado na fase oleosa.

Quando este complexo está em contato direto com uma fase oleosa contendo um emulsionante lipofílico polimérico como o Pluronic L101<sup>®</sup>, então o aumento na estabilidade pode ser devido a interação polímero-polímero na interface. Se a fase oleosa contém um emulsionante lipofílico de peso molecular pequeno

como o Span 80<sup>®</sup>, a estabilidade pode ser devida a um aumento na adsorção na interface no sistema.

O propósito da estabilização da interface A<sub>1</sub>/O na preparação de emulsões múltiplas é o de reduzir o potencial para a coalescência das gotículas de água encapsuladas ou a sua expulsão dos glóbulos de óleo múltiplos ou, para prevenir a coalescência dos glóbulos de óleo múltiplos.

#### 3.2.1.4 Natureza da fase oleosa

As propriedades da fase oleosa são importantes na determinação da estabilidade do sistema e controle dos índices de transferência dos solutos. A natureza da fase oleosa pode afetar, acentuadamente, as propriedades do sistema, influenciando no tamanho das gotículas aquosas internas e dos glóbulos múltiplos (COLE; WHATELEY, 1995). Destas propriedades, a mais importante é a viscosidade (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

A maioria dos óleos formam emulsões múltiplas se as condições de processamento adequadas forem aplicadas (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Estudos foram conduzidos em diferentes sistemas A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> usando uma mistura de dois óleos: um isoparafínico de alta viscosidade e um parafínico leve. As proporções relativas de cada óleo afetaram a viscosidade da fase oleosa. Quanto mais alta a concentração de óleo de alta viscosidade maior a estabilidade do sistema em relação à ruptura do filme oleoso e o controle dos índices de transferência dos solutos através da membrana oleosa (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Para produtos farmacêuticos, os óleos utilizados incluem os hidrocarbonetos refinados como parafina líquida leve, esqualeno e ésteres de ácidos graxos de cadeia longa incluindo os óleos vegetais, por exemplo oleato de etila e miristato de isopropila (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Outros óleos utilizados incluem os vários óleos de origem vegetal como o óleo de oliva, sésamo, soja, amendoim e girassol se purificados corretamente, pois a fase oleosa a ser empregada em uma emulsão farmacêutica deve ser não tóxica (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Como regra geral, os óleos minerais produzem emulsões múltiplas mais estáveis que aquelas produzidas com óleos vegetais. A ordem decrescente de estabilidade e percentagem de encapsulação tem sido apontada como sendo parafina líquida leve > esqualeno > óleo de sésamo > óleo de amendoim (KUMAR, KUMAR; MAHADEVAN, 2012).

Dentre os óleos minerais, aqueles de viscosidade elevada são os que produzem as emulsões mais estáveis. A elevada viscosidade dificulta ou impede a difusão de água e de substâncias solúveis na água entre as fases aquosas interna e externa do sistema múltiplo e as alterações na emulsão ocorrem significativamente mais devagar (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; JIGAR et al., 2011; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

#### 3.2.1.5 Propriedades dos filmes interfaciais

Um emulsionante lipofílico e outro hidrofílico são necessários para formar uma emulsão estável  $A_1/O/A_2$ . Assim, tanto a composição química quanto a concentração utilizada dos emulsionantes na obtenção destes sistemas múltiplos tem sido estudados por diversos autores (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; SCHMIDTS et al., 2009; CARLOTTI et al., 2005; GEIGER et al., 1998; COLE; WHATELEY, 1995).

Emulsionantes com propriedades químicas compatíveis com os componentes da emulsão e com valores de EHL adequados ao sistema são necessários para a obtenção de emulsões estáveis. Os valores de EHL do emulsionantes hidrofílicos usados no preparo de emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  variam de 12 a 22 e são quimicamente ésteres e éteres de ácidos graxos polietoxilados ou poliméricos. Para estabilizar a interface da emulsão primária  $A_1/O$ , o valor de EHL do emulsionante deve ficar entre 2 e 7 (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Em estudos realizados por Schmidts e colaboradores (2009) foram utilizados vários emulsionantes hidrofílicos como ésteres de sorbitano polietoxilado e ácidos graxos, conhecidos como polisorbatos ou Tweens<sup>®</sup>; ésteres de derivados

polietoxilados de ácido esteárico, como exemplo o PEG – 20 stearate<sup>®</sup> e ésteres da sucrose, como a Sucrose palmitate<sup>®</sup>. Também foram utilizados éteres de álcoois graxos polietoxilados, como exemplo o Steareth – 20<sup>®</sup> e o emulsionante polimérico Poloxamer 407<sup>®</sup>. Neste estudo foi possível observar a influência do valor de EHL do sistema como também a composição química e compatibilidade do emulsionante hidrofílico influenciam as propriedades e a estabilidade das emulsões múltiplas A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>. Foi demonstrado que emulsões múltiplas com ótimas propriedades e estabilidade foram obtidas usando álcoois graxos polietoxilados. Estes PEG éteres possuem propriedades semelhantes aos PEG ésteres, mas possuem maior estabilidade hidrolítica, permitindo seu uso em valores extremos de pH. Também são capazes de tolerar altos níveis de eletrólitos quando comparados aos emulsionantes do tipo éster devido a ausência de ligação éster.

Este estudo também demonstrou que o tamanho dos glóbulos e a encapsulação de NaCl foram dependentes do valor de EHL mas não a viscosidade do sistema. Um EHL entre 14 e 15 forneceu os menores glóbulos e a melhor encapsulação, o aumento do EHL aumentou o tamanho dos glóbulos e a liberação do NaCl para a fase aquosa externa do sistema. Também foi observado que uma mistura de emulsionantes ao invés de um único emulsionante com o mesmo valor de EHL, coopera na obtenção de glóbulos menores.

A concentração dos emulsionantes também afeta a estabilidade dos sistemas emulsionados. Quantidades muito pequenas podem resultar em sistemas instáveis e muito elevadas podem ser tóxicas e mesmo desestabilizantes do sistema (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012).

Contudo, para cada sistema emulsionado existe uma concentração adequada de emulsionantes para sua estabilização. Uma concentração baixa pode ocasionar degradação rápida da emulsão e uma alta pode aumentar a sua viscosidade, porém há o inconveniente da toxicidade. De maneira geral usa-se de 1 a 10% de emulsionante (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Deve-se considerar um índice de concentração 10 vezes maior de emulsionante lipofílico para a fase A<sub>1</sub>/O em relação à fase O/A<sub>2</sub> devido à solubilização das moléculas do emulsionante primário lipofílico na fase aquosa externa O/A<sub>2</sub>. Esta solubilização acontece quando a concentração do emulsionante

secundário hidrofílico excede a concentração micelar crítica (CMC) (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Se ocorre aumento de concentração do emulsionante secundário hidrofílico, mais do emulsionante primário lipofílico pode ser incorporado nas micelas, ocasionando a diminuição de sua concentração na fase oleosa e o sistema sofre desestabilização, que pode conduzir à ruptura da camada oleosa, resultando na perda das gotículas aquosas internas (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Contudo, deve-se levar em consideração que nas emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  o emulsionante hidrofílico pode sofrer a influência da migração do emulsificante lipofílico utilizado para o preparo da primeira emulsão  $A_1/O$ . Assim, o valor do EHL na interface  $O/A_2$  não corresponde mais ao valor do EHL do emulsionante hidrofílico utilizado mas sim à soma de ambos, incluso as concentrações de cada um no sistema (do inglês “*weighted HLB*”). Este fato relaciona-se à inversão da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  em  $O/A$  e ocorre quando o EHL correspondente à soma dos emulsificantes presentes no sistema for maior que 10 (SCHMIDTS et al., 2009; FRENKEL; SHWARTZ; GARTI, 1983).

O emulsionante lipofílico, durante a dilatação de fase que acontece quando ocorre fluxo de água da fase aquosa externa para a fase aquosa interna do sistema, pode difundir da primeira para a segunda interface, conferindo rigidez à membrana, ou da fase oleosa para a primeira interface, resultando no decréscimo da coalescência das gotículas aquosas durante a dilatação. A concentração do emulsionante lipofílico desempenha um papel predominante neste mecanismo. Parece que de um lado, a capacidade de dilatação do glóbulo aumenta com a sua concentração e, por outro, quanto maior a dilatação do glóbulo de óleo, menor a liberação de fármaco hidrossolúvel (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; GEIGER et al., 1998; JAGER-LEZER et al. 1997).

O Tween 80<sup>®</sup> é frequentemente utilizado em combinação com o Span 80<sup>®</sup> em emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  devido à estrutura química semelhante de ambos. Tem sido observado que, na maioria dos casos, as emulsões mais estáveis são formadas quando os emulsionantes possuem o mesmo comprimento de cadeia hidrocarbonada (SCHMIDTS et al., 2009).

### 3.2.1.6 Relação de volume entre as fases, método de preparo e variáveis de processo

Em trabalho desenvolvido por Matsumoto, Kita e Yonezawa (1976) foi constatado que o volume da fase interna  $A_1/O$  não apresentava efeito significativo na obtenção da emulsão  $A_1/O/A_2$  sob as condições experimentais estudadas. Este estudo demonstrou que as emulsões  $A_1/O/A_2$  podem ser preparadas utilizando ampla variação de volume na fase interna  $A_1/O$ , em intervalo ótimo de 25–50% (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Resultados interessantes obtidos por Matsumoto, Kita e Yonezawa (1976) sugeriram que o volume da fase aquosa secundária  $A_1/O/A_2$  influencia na formação dos glóbulos múltiplos sob um intervalo de frações de baixo volume. Quando o volume  $A_1/O/A_2$  ultrapassou cerca de 0,4 não ocorreram efeitos significativos. Foi também observado que o volume da fase interna  $A_1/O$  influenciou a liberação de substâncias encapsuladas na fase aquosa interna (FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Em trabalho de Florence e Whitehill (1982) os autores sugerem que uma típica emulsão  $A_1/O/A_2$  deve ser preparada da seguinte maneira: (i) a emulsão primária  $A_1/O$  pode ser formulada com miristato de isopropila (47,5%), emulsionante lipofílico monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) (2,5%) e água destilada q.s.p. 100%. (ii) A emulsão múltipla água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) pode então ser preparada adicionando a emulsão primária  $A_1/O$  (50%) em uma solução aquosa contendo o emulsionante hidrofílico polioxietileno (20) monooleato de sorbitano (Tween 80<sup>®</sup>) (2%).

Em trabalho de Florence e Whitehill (1981) emulsões múltiplas foram preparadas por processo em duas etapas da seguinte maneira: (i) a fase aquosa  $A_1$  foi emulsionada em igual quantidade de óleo contendo 5% m/m de Span 80<sup>®</sup> por meio de um pequeno misturador por vibração para formar a emulsão primária  $A_1/O$ . (ii) A emulsão  $A_1/O$  foi re-emulsionada da mesma maneira em igual quantidade de água contendo 2% m/m de emulsionante ou sistema emulsionante hidrofílico.

Em trabalho de Jigar e colaboradores (2011) emulsões múltiplas contendo o fármaco atorvastatina foram preparadas por processo de emulsificação em duas etapas: (i) preparo da emulsão primária e (ii) emulsificação secundária.

Considerando o volume entre as fases, na emulsificação primária 12,0 mL de água destilada foram acrescentadas a 28,0 mL de fase oleosa contendo o emulsificante primário. Na emulsificação secundária 30,0 mL da emulsão primária viscosa foi posteriormente emulsificada com uma fase aquosa externa contendo o emulsificante secundário. Diferentes variáveis foram analisadas como o tipo e concentração dos emulsionantes, velocidade e tempo de rotação e fração de volume das fases interna e externa do sistema.

Dos resultados obtidos para a emulsão primária o emulsionante Span 60<sup>®</sup> em concentração de 10% forneceu boa estabilidade ao sistema e alta eficiência de encapsulação em velocidade de 5000 r/min por tempo de 10 minutos e fração de volume de fase interna: fase externa (30:70). Esta emulsão primária foi utilizada para a emulsificação secundária utilizando Tween 80<sup>®</sup> em concentração de 16% para boa estabilidade e máxima capacidade de encapsulação em velocidade de 1500 r/min por tempo de 7 minutos e mantido a fração de volume de fase interna : fase externa (30:70).

Em trabalho desenvolvido por Cole e Whateley (1995) onde foram utilizados complexos de emulsionante hidrofílico polimérico e polímero de ácido poli-acrílico na fase aquosa interna do sistema o índice de relação de fases  $A_1/O/A_2$  foi de 1:2:3, respectivamente.

A quantidade de água dispersada na emulsão primária  $A_1/O$ , expressa como um índice de volume de fases  $A_1/O/A_2$ , pode influenciar tanto a obtenção quanto a estabilidade do sistema emulsionado final (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012).

### 3.3 PELE E PERMEAÇÃO

#### 3.3.1 Pele

A pele é o maior sistema orgânico do corpo, correspondendo a aproximadamente 20% do peso corporal, com área de mais 1m<sup>2</sup> de superfície. Constitui o limite anatômico do organismo animal, atuando como uma verdadeira

capa protetora sem a qual a vida se tornaria impossível, formando uma barreira impermeável para quase todas as substâncias sólidas, líquidas, ou gasosas. Como uma fronteira entre o meio ambiente e o corpo, a pele exerce várias funções como o controle da homeostase; da temperatura corporal; protegendo o DNA contra agressão solar, devido à melanina e a queratina; apresenta função sensorial e imunológica, e atua no metabolismo, através da síntese de vitamina D. Nela também se refletem os sentimentos e emoções, como vergonha ou angústia, medo e ansiedade (DEY et al., 2014; KUBO, 2014; BONTE, 2011; DARLENSKI et al., 2009; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; KEDE; SABATOVICH, 2004; OBAGI, 2004; PERSSONELLE, 2004; GANONG, 1999; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999; STEVENS; LOWE, 1992; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

Possui estrutura complexa, disposta em três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é um epitélio versátil cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam periodicamente. Se diferenciam, quer dizer, se especializam para cumprir determinadas funções, que no caso da epiderme são duas, fundamentalmente protetoras, pela síntese de uma proteína chamada queratina (queratos = córneo) que cornifica na superfície cutânea; e a síntese do pigmento conhecido como melanina (melas = negro). Apesar de uma grande variação de espessura dependendo da região anatômica, pode-se dizer que a epiderme tem aproximadamente 100 µm de espessura. O ciclo de maturação das células epidérmicas para a renovação celular é definido pelo tempo entre a maturação, migração e esfoliação celular. O ciclo de uma pele normal é de 28 a 60 dias, com uma média de 40 dias (ANGELOVA-FISCHER et al., 2014; SMEDEN et al., 2014; KUBO, 2014; JUNGMAN et al., 2012; DAMIEN; BONCHEVA, 2010; DAL'BELO, 2008; LEONARDI; CHORILLI, 2008; OBAGI, 2004; RITCHER et al., 2004; CUZZI-MAYA; PIÑEIRO-MACEIRA, 2001; GANONG, 1999; WARNER; LILLY, 1994; LÉVÊQUE et al., 1994; STEVENS; LOWE, 1992; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

Histologicamente a epiderme é disposta em quatro camadas ou estratos: basal, espinhosa, granulosa e córnea. A camada basal está disposta sobre a junção dermoepidérmica e é constituída por células proliferativas que originam todas as demais células da epiderme, nutridas através dos vasos sanguíneos localizados na derme. A camada subsequente, denominada espinhosa, apresenta como principal característica um grande número de desmossomos em sua superfície, agindo na

manutenção da estrutura. A camada granulosa, por sua vez, está repleta de grânulos queratoalínicos no citoplasma, prevenindo a desidratação das camadas subjacentes da epiderme, formando uma barreira e oferecendo resistência à absorção percutânea. A camada córnea é a mais superficial da epiderme e consiste de células amorfas em contínua descamação, regulando a transferência de substâncias químicas e prevenindo a perda rápida de água da epiderme para o meio ambiente (COUTO et al., 2014; DEY et al., 2014; SMEDEN et al., 2014; JUNGMAN et al., 2012; BONTE, 2011; VAZQUEZ; MORENO; SANCHEZ, 2011; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; HARDING, 2004; BAUMANN, 2004; KEDE; SABATOVICH, 2004; PINTO, 2003; CUZZI-MAYA; PIÑEIRO-MACEIRA, 2001; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999; GANONG, 1999; STEVENS; LOWE, 1992; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

A derme é uma camada de tecido conjuntivo, composta principalmente por fibras colágenas e elásticas, possuindo uma espessura entre 10 a 20 vezes mais espessa que a epiderme. Regula a morfogênese e a diferenciação da epiderme. Contém os apêndices cutâneos que são de dois tipos: córneos (pêlos e unhas) e glandulares (glândulas sebáceas e sudoríparas). Além de garantir a sustentação, a derme contém os vasos sanguíneos, garantindo os nutrientes para a pele. É também a partir da derme que ocorre a hidratação das camadas superiores, contribuindo para a coesão celular, essencial à função de barreira cutânea (COUTO et al., 2014; OBAGI, 2004; KEDE; SABATOVICH, 2004; PERSSONELLE, 2004; CUZZI-MAYA; PIÑEIRO-MACEIRA, 2001; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999; HAAKE; HOLBROKE, 1999).

A hipoderme é formada por um tecido conjuntivo adiposo e fibrilar, que desempenha um papel importante de proteção mecânica, conservação da homeotermia e reserva de energia. Por se encontrar abaixo do sistema vascular localizado na derme, não interfere na absorção percutânea (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; OBAGI, 2004; KEDE; SABATOVICH, 2004; CUZZI-MAYA; PIÑEIRO-MACEIRA, 2001; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

A pigmentação cutânea ocorre a partir das melaninas, que são produzidas pelos melanócitos na camada basal da epiderme. O processo de melanogênese pode ser resumido em três fases, contemplando a síntese dos melanossomos, a

melanização dos melanossomos e a transferência dos melanossomos. A composição química da melanina é determinada a partir da ação da enzima tirosinase, sobre o aminoácido tirosina, com produção de diidroxifenilalanina (DOPA), que posteriormente transforma-se em dopaquinona, que depois da ciclização torna-se a eumelanina ou depois da ação de cisteína, em feomelanina (ZATTA, 2011; PERSSONELLE, 2004; BAUMANN, 2004; KEDE; SABATOVICH, 2004; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999).

Com relação à hidratação cutânea, temos que a água encontra-se em sua grande maioria no interior das células. Para garantir uma barreira à perda de água existem os corneócitos e, paralelamente para fixar a água nos corneócitos, existe o fator de hidratação natural, constituído de substâncias higroscópicas. O filme hidrolipídico proveniente do suor e do sebo e o cimento intercelular, composto essencialmente de suor e lipídios, respectivamente, permitem a captação de água, coesão dos corneócitos e a impermeabilidade da camada córnea (ANGELOVA-FISCHER et al., 2014; JUNGMAN et al., 2012; VAZQUEZ; MORENO; SANCHEZ, 2011; BAUMANN, 2004; KEDE; SABATOVICH, 2004; CUZZI-MAYA; PIÑEIRO-MACEIRA, 2001; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999; LÉVÊQUE et al., 1994).

Ao nível de derme e hipoderme, a água encontra-se extracelular, ligada às macromoléculas da matriz intercelular como, por exemplo, as glucosaminoglicanas (GAGs), tais como o ácido hialurônico, que desempenha um importante papel na hidratação do tecido conjuntivo (PERSSONELLE, 2004; FRESNEL; HERNANDEZ, 1999).

As aquaporinas são, por sua vez, proteínas de membrana que possibilitam a passagem de água através das células da pele, e funcionam como canais especializados de água (BONTE, 2011; VAZQUEZ; MORENO; SANCHEZ, 2011; LI et al., 2010; KING; KOZONO; AGRE, 2004).

### 3.3.2 Permeação cutânea

Uma substância consegue atravessar a camada córnea por três vias: entre os corneócitos, permanecendo na matriz lipídica (via intercelular); através dos

corneócitos e da matriz lipídica (via intracelular ou transcelular) ou através dos anexos da pele (via apêndices ou transanexial) (LEONARDI; CHORILLI, 2008; BROWN; JONES, 2005).

A via intracelular ou transcelular requer múltipla partição entre os corneócitos e os lipídios intercelulares. É o caminho principal para a permeação cutânea de moléculas solúveis na água, devido à estrutura da queratina, responsável pela resistência difusional majoritária da pele para moléculas hidrossolúveis, através da ligação de hidrogênio (FRASCH; BARBERO, 2013; OCHALEK et al, 2012; BONTE, 2011; VAZQUEZ; MORENO; SANCHEZ, 2011; WIESCHER, 2008; LEONARDI; CHORILLI, 2008; CHIEN, 1992).

A via intercelular constitui o caminho para a maioria das moléculas. Considerando a penetração da água deve-se considerar a estrutura lamelar em bicamada como as ceramidas, que possuem a capacidade de retenção da água, impedindo que ela passe facilmente através da pele. A via de penetração para moléculas lipossolúveis não é bem compreendida e possivelmente segue os lipídios endógenos dentro da camada córnea, onde primeiramente se acumulam (WIESCHER, 2008; BOWESTRA, 2000; CHIEN, 1992).

A via transanexial abrange minimamente a penetração, por apresentar apenas 0,1% da área total da pele, é constituída por folículos pilo-sebáceos e glândulas sudoríparas. A seletividade de penetração por esta via é devida à menor espessura da camada córnea e também porque as glândulas sebáceas, que secretam seu conteúdo no ducto pilo-sebáceo, contém lipídios diversos em sua composição, sendo alguns emulsionantes, o que permite a entrada de moléculas muito lipofílicas como também de moléculas em combinação com certos tensoativos e glicóis. Já o caminho pelos poros polares, que consistem de “ilhas” aquosas que estão presentes entre as células rodeados por lipídios polares, permitem a entrada para moléculas hidrossolúveis. O caminho transanexial, visto como um todo, é o de escolha para compostos com elevado coeficiente de partilha óleo/água. Permite também a permeação de íons, substâncias solúveis na água, moléculas extremamente grandes e compostos polares polifuncionais como o cortisol (JUNGMAN et al., 2012; OCHALEK et al, 2012; BONTE, 2011; LEONARDI; CHORILLI, 2008; BROWN; JONES, 2005; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; BAUMANN, 2004; CHIEN, 1992).

Para que um fármaco possa permear a pele até atingir a corrente sanguínea, existe uma determinada sequência de passos que ele deve obrigatoriamente percorrer, sendo a difusão ou transporte pela superfície da pele; partição da substância química pelo estrato córneo; difusão pelo meio intercelular da camada córnea; difusão pela epiderme viável e derme superior; captação do permeante pelo vaso sanguíneo cutâneo e acesso sistêmico (LEONARDI; CHORILLI, 2008; MARTINS; VEIGA, 2002).

Certas substâncias dificilmente penetram na pele porque apresentam coeficiente de difusibilidade muito baixo. Por exemplo, moléculas que apresentam alta massa molecular, apresentam dificuldade de penetração em virtude do seu volume. Ocorre a redução da difusibilidade também se o número de grupamentos hidrófilos da molécula aumentam, por causa das ligações de hidrogênio que ocorrem no estrato córneo. Além disso, o grau de hidratação do estrato córneo é importante para determinar a taxa de absorção percutânea de substâncias ativas. O nível de hidratação é uma função do gradiente de concentração de água entre a derme e a superfície da pele. Assim, um aumento na permeabilidade da pele a água corresponde a um aumento da permeabilidade aos compostos aplicados topicamente (COUTO et al., 2014; LEONARDI; CHORILLI, 2008; SIQUEIRA, 2008).

O coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo é um dos fatores que controlam a permeabilidade do ativo, que estabelece uma alta concentração de medicamento inicial sobre as camadas externas da pele. A eficácia de um produto para aplicação cutânea depende da correlação entre os coeficientes de permeabilidade no estrato córneo e as características químicas do ativo (LEONARDI; CHORILLI, 2008; MARTINS; VEIGA, 2002).

### 3.4 COMPONENTE ATIVO – SULFATO DE GLUCOSAMINA (D) (2KCl)

#### 3.4.1 Aspectos gerais

Os glucosaminoglicanos (GAGs) são polímeros compostos por cadeias lineares de polissacarídeos aniônicos de alto peso molecular que consistem em

repetições de unidades específicas de dissacarídeos, que estão ligados a um núcleo de proteína. Como representantes de GAGs tem o ácido hialurônico e o queratam sulfato (JANG-HEE et al., 2011; SANTOS, 2009; ROUGHLEY, 2006; TAYLOR; GALLO, 2006; LAMARI; KARAMANOS, 2006; TOFFOLETTO et al., 2005).

Os GAGs apresentam um variado número de funções reguladoras estruturais e fisiológicas na pele, dentre as quais se destaca a manutenção de água do tecido. Devido à sua propriedade química de possuir carga altamente negativa, resultante da presença de grupos carboxílicos e sulfato, os GAGs tem alta capacidade de retenção de água, o que permite a atuação no suporte dos componentes celulares e fibrosos do tecido, com capacidade compressiva e tensora (JANG-HEE et al., 2011; SANTOS, 2009; GARNER et al., 2007; MILEWSKI, 2002; DAVIDSON, 2000).

A maior parte dos GAGs encontrados em ossos e cartilagens é constituída por sulfato de condroitina. Os GAGs mais abundantes na derme são o ácido hialurônico (AH) e o dermatan-sulfato. A maioria dos estudos da pele humana mostra uma diminuição relacionada à idade na síntese de glucosaminoglicanos. A diminuição dos glucosaminoglicanos solúveis pode explicar o aspecto ressecado e as rugas da pele envelhecida como se tivesse perdido seu teor de água, embora o teor de água não diminua com o tempo, de acordo com estudos (JANG-HEE et al., 2011; SANTOS, 2009; GARNER et al., 2007; TOFFOLETTO et al., 2005; BAUMANN, 2004; OBAGI, 2004).

Com exceção do ácido hialurônico todos os glucosaminos e/ou galactosaminoglicanos são encontrados na forma de proteoglicanos, que são macromoléculas complexas covalentemente ligadas (MIZUMOTO et al., 2013; SANTOS, 2009; ROSSIGNOLI; PONTAROLO; CORRER, 2008; PAVÃO; VILELA-SILVA; MOURÃO, 2006; TOFFOLETTO et al., 2005).

O ácido hialurônico (AH) é caracterizado como um polissacarídeo polianiónico, de alta massa molar, de ocorrência natural, que consiste de unidades repetidas de N-acetil-glucosamina e ácido  $\beta$ -glucorônico, unidas por uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,3 e arranjadas como repetidas unidades dissacarídicas através da ligação  $\beta$ -1,4. Presente na matriz extracelular da maioria dos tecidos conjuntivos de vertebrados, sendo abundante na pele, onde constitui uma grande fração da matriz extracelular da derme. As interações por ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, em

combinação com a repulsão eletrostática, permite que um grande número de moléculas se agregem, levando à formação de redes moleculares (matrizes) de ácido hialurônico (BONTE, 2011; SOUSA, 2007; BISSETT, 2006; BROWN; JONES, 2005; GRIBBON; HENG; HARDINGHAM, 2000; JUHLIN, 1997).

O AH é sintetizado na membrana plasmática e segregado diretamente para dentro da matriz extracelular. A grande maioria está presente na pele, preenchendo os espaços extracelulares, mantendo a hidratação dos tecidos e contribuindo diretamente na regulação de algumas funções fisiológicas, tais como na migração e proliferação celular, na resposta inflamatória e no processo de cicatrização de feridas (ZHOU et al., 2013; JANG-HEE et al., 2011; BONTE, 2011; SOUZA; PINHAL, 2011; SOUSA, 2007; BOURGUIGNON et al., 2006; BISSETT, 2006; BROWN; JONES, 2005; WEINDL et al., 2004).

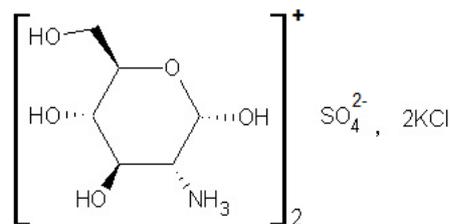
O AH também tem a capacidade de reter a água e mantê-la no espaço extracelular, sendo assim importante para a hidratação e elasticidade da pele. Um declínio no teor de ácido hialurônico na epiderme ocorre durante o envelhecimento, contribuindo para a diminuição da hidratação e aumento da formação de rugas (ISHAQ, 2013; BECKER et al., 2009; BISSETT, 2006; BROWN; JONES, 2005; SAYO; SAKAI; INOUE, 2004; GRIBBON; HENG; HARDINGHAM, 2000).

Extensos estudos sobre as propriedades químicas e físico-químicas do AH e seu papel fisiológico nos seres humanos, juntamente com suas propriedades versáteis, tais como biocompatibilidade, não imunogenicidade, biodegradabilidade e viscoelasticidade, o torna indicado como biomaterial ideal para cosméticos, aplicações médicas e farmacêuticas. Relata-se a utilização cosmética ao realizar a injeção para preenchimento cutâneo, podendo reduzir as rugas e linhas faciais, com menos efeitos colaterais e melhor tolerabilidade em comparação com o uso de colágeno. A aplicação em produtos cosméticos para a pele é relatado com a função de hidratar e restaurar a elasticidade, conseguindo-se assim um efeito anti-rugas. Estudos demonstram que formulações ou protetores solares cosméticos à base de AH protegem a pele contra a radiação ultravioleta devido às suas propriedades de eliminação de radicais livres (LEE, 2013; BECKER et al., 2009; BROWN; JONES, 2005; TROMMER; WARTEWIG; BOTTCHEER, 2003).

#### 3.4.2 Sulfato de Glucosamina (D) (2KCl)

A glucosamina é um produto do metabolismo da glucose e está presente em todos os tecidos humanos, sendo um dos principais componentes dos glucosaminoglicanos (GAGs). Produzida pelo organismo humano através da adição de um grupo amino à molécula de glucose, que é então acetilada, tornando-se a N-acetil-glucosamina (NAG), um metabólito da glucosamina. Estruturalmente, a glucosamina é uma molécula de glucose, modificada com um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) em substituição a um grupamento hidroxila ( $\text{OH}$ ) no carbono dois (C-2), conforme pode ser observado na Figura 2 (SOO-YOUL; CHANG-HOON; AI-YOUNG, 2012; GARNER et al., 2007; JACOBS, 2007; BISSETT, 2006; TOFFOLETTO et al., 2005; PAVELKÁ et al., 2002; DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl)



FONTE: Adaptado de MALLU et al.(2010).

Tanto a glucosamina e o seu derivado NAG são amino-mono-sacarídeos que aparecem em funções bioquímicas essenciais, como precursores de substrato para a biossíntese de polímeros, tais como os GAGs na produção de proteoglicanos e na inibição da síntese de enzimas proteolíticas. É o constituinte fundamental para a biossíntese de compostos, tais como glucolipídeos e lipoproteínas, sendo um componente da matriz da cartilagem e líquido sinovial (LOPES JÚNIOR; INACIO, 2013; ERHAN et al., 2012; SOO-YOUL; CHANG-HOON; AI-YOUNG, 2012; BISSETT, 2009; ROSSIGNOLI; PONTAROLO; CORRER, 2008; LOZADA, 2007; BRUYERE; REGINSTER, 2007; GARNER, 2005; AGHAZADEH-HABASHI et al., 2002; MIWA et al., 1994).

A N-acetil-glucosamina (NAG) tem fórmula molecular de  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6$  e massa molar de 221,21 g/mol e, por ser um metabólito acetilado de glucosamina, é menos polar e neutra que o sulfato de glucosamina. A NAG é mais conhecida por seu papel

como precursor do ácido hialurônico. Este polímero com funções estruturais e de hidratação, é importante na matriz extracelular dos tecidos, tais como articulações e da pele, tanto na epiderme quanto na derme (SHATALEBI; MOSTAFAVI; MOGHADDAS, 2010; GARNER et al., 2007; GARNER, 2005; SAYO; SAKAI; INOUE, 2004).

No organismo humano a glucosamina é formada a partir da glucosamina-6-fosfato. A glucosamina é o substrato para a biossíntese das macromoléculas, tais como o sulfato de condroitina e o ácido hialurônico, importante componente estrutural de ligação de água na epiderme e derme, o qual fornece a estrutura para a formação do colágeno, bem como preserva a hidratação e a elasticidade da pele (MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2013; ISRAEL et al., 2012; JACOBS, 2007; GARNER, 2005; GOUZE et al., 2002; MILEWSKI, 2002; SHIKHMAN et al., 2001; DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

No mercado existem três tipos de glucosaminas disponíveis, sendo elas o cloridrato de glucosamina (retirada da casca de caranguejo), o sulfato de glucosamina (retirada da casca de camarão) e a N-acetil-glucosamina, obtida por derivatização. A maior parte da glucosamina nestes suplementos é um derivado da quitina encontrada em exoesqueletos marinhos (LOPES JÚNIOR; INACIO, 2013; HATHCOCK; SHAO, 2007; BISSETT, 2006; ANDERSON; NICOLOSI, BORZELLECA, 2005; CHEN, 2005; GARNER, 2005; RICHY et al., 2003; MCALINDON et al., 2000).

Os recentes avanços tecnológicos têm levado a um meio mais eficiente de produção, a partir de uma fonte vegetal, utilizando um processo de fermentação microbiana de glucose derivada do milho, reduzindo o risco para os pacientes com alergia a suplementos marinhos. Atualmente, a glucosamina e os seus metabólitos, na forma de sal (sulfato, cloridrato, etc.), não são classificados como medicamentos, mas sim como suplementos nutracêuticos e/ou dietéticos, de acordo com o Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos (EUA). No entanto, em alguns países europeus, o sulfato de glucosamina foi aprovado como um medicamento de prescrição (GARNER et al., 2007; HATHCOCK; SHAO, 2007; KANWISCHER et al., 2005; GARNER, 2005; ALMADA, 2003; MCALINDON et al., 2000; LEWIS, 2000; HAUSELMANN, 2001; THEODASAKIS; FOX; ADDERLY, 1997; FDA, 1995).

O cloridrato de glucosamina é considerado mais estável, mas o sulfato de

glucosamina pode ter uma maior eficácia biológica, devido ao sulfato também ser um componente da matriz cartilaginosa. O sulfato de glucosamina apresenta-se como um pó cristalino incolor, em forma de agulha, altamente polar e básico, que apresenta determinada carga iônica, é degradado a 110°C, dissolve-se facilmente em água e apresenta peso molecular relativamente baixo de 456,42 g/mol (SOO-YOUL; CHANG-HOON; AI-YOUNG, 2012; GARNER et al., 2007; BRUYERE; REGINSTER, 2007; GARNER, 2005; DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

As formulações contendo glucosamina possuem pouca estabilidade, pois sofrem facilmente a reação de Maillard, conduzindo a formação de um produto polimérico de coloração castanho. Este fato ocorre quando grandes quantidades de açúcares e aminoácidos são expostos a temperaturas elevadas. Pode ser controlado até certo ponto pela utilização de antioxidantes e de pH ácido (5,0). Apesar da característica hidrofílica, estudos demonstraram taxa de penetração de sulfato de glucosamina adequada na pele, o que torna possível a sugestão de uso tópico do produto (CIFTER et al., 2013; ERHAN et al., 2012; BISSETT, 2009; JACOBS, 2007; BIGGEE et al., 2006; KANWISCHER et al., 2005; BRUINS et al., 2003).

Os ensaios clínicos têm considerado a glucosamina como sendo um modificador da história natural da osteoartrose, demonstrando benefícios na utilização de suplementação de glucosamina oral para melhorar os sintomas e retardar a progressão da osteoartrite em humanos. A atividade da glucosamina na osteoartrite está provavelmente relacionada a efeitos tanto anti-inflamatórios quanto condroprotetores (CAPOMACCHIA; GARNER, 2013; LOPES JÚNIOR; INACIO, 2013; ISRAEL et al., 2012; SOO-YOUL; CHANG-HOON; AI-YOUNG, 2012; HATHCOCK; SHAO, 2007; JACOBS, 2007; BISSETT, 2006; KANWISCHER et al., 2005; RICHY et al., 2003; LIPPIELLO et al., 2000; FENTON; CHLEBEK-BROWN; PETERS, 2000; McALINDON et al., 2000; DEAL; MOSKOWITZ, 1999; BASSLEER et al., 1998).

Embora a maior parte da literatura publicada sobre a glucosamina incida na utilização oral no tratamento e prevenção da artrite e de seus sintomas, existem vários estudos a respeito dos seus efeitos benéficos nas administrações tópicas e orais relacionados à pele. Devido à sua estimulação da síntese de ácido hialurônico por queratinócitos humanos, demonstrou-se que a glucosamina é capaz de acelerar a cicatrização de feridas, melhorar a hidratação da pele e, eventualmente, ser

utilizada para tratamento anti-rugas, através da construção da matriz estrutural da pele (BISSETT, 2009; BISSETT, 2006; SAYO; SAKAI; INOUE, 2004).

A administração de NAG por via oral, em indivíduos com pele seca, demonstrou efetividade na hidratação cutânea (BISSETT, 2009; JACOBS, 2007). Em tratamento tópico *in vivo*, observou-se um aumento na renovação celular, devido a interação com as glucoproteínas envolvidas na ligação com corneócitos e na coesão intercelular (MAMMONE et al., 2009; GREEN et al., 2007; HUDSON; SLEEMAN; WATT, 1995).

Em estudos recentes *in vitro* utilizando cultura celular equivalente a pele humana foi demonstrado aumento na produção de ácido hialurônico, em tratamento tópico com NAG, sozinho e em combinação com a niacinamida, precursor do NAD(P), um cofator essencial para a síntese de ácido hialurônico (OSBORNE; MULLINS; ROBINSON, 2006; BISSETT, 2006).

Investigações científicas têm demonstrado que a glucosamina, bem como seus metabólitos, podem estimular a ligação de água com GAGs por fibroblastos e queratinócitos, proporcionando assim uma base para o seu uso em cosméticos anti-idade (SAYO; SAKAI; INOUE, 2004). Um estudo para o tratamento do envelhecimento cutâneo utilizando NAG revelou efeitos cosméticos valiosos, incluindo aumento de firmeza e elasticidade, com um correspondente aumento na espessura da pele. Acredita-se que este papel do sulfato de glucosamina é desempenhado devido ao fato de que é um componente essencial dos proteoglicanos, que constituem a estrutura de colágeno e, também, pela retenção de água, aumentando a flexibilidade e a resistência à compressão (GREEN et al., 2007; JACOBS, 2007; GREEN et al., 2004).

Clinicamente, a N-acetil-glucosamina foi documentada por melhorar a condição da pele. Em um estudo duplo-cego randomizado, voluntários do sexo feminino com pele seca receberam uma dose diária de 1000mg de NAG ou placebo por via oral, durante um período de 60 dias. Após o tratamento, houve um aumento significativo no teor de umidade da pele, e um decréscimo no teor de óleo e gordura, concluindo-se que a glucosamina, por suplementação oral, pode ser benéfica para melhorar a hidratação da pele (BISSETT, 2009; BISSETT, 2006).

A administração de glucosamina por via oral, em determinada dosagem, reforça a síntese do ácido hialurônico. Um aumento na síntese de ácido hialurônico,

durante o processo de cicatrização de feridas, acelera a cicatrização e reduz o risco de complicações. O uso tópico de glucosamina, em um estudo duplo-cego randomizado, com voluntários do sexo feminino utilizando aplicação tópica de 2% de NAG, demonstrou eficácia na redução de rugas, em particular na região facial, bem como redução do inchaço na área dos olhos, após dez dias de aplicação tópica (BISSETT, 2009; BISSETT, 2006; JACOBS, 2007; OSBORNE; MULLINS; ROBINSON, 2006).

Em 2001, um estudo com 53 voluntários do sexo feminino utilizando um suplemento oral contendo "glucosamina, aminoácidos, minerais e vários compostos antioxidantes" versus 12 indivíduos do grupo controle-placebo, apresentaram uma redução de 34% no número de rugas visíveis e linhas finas. Observou-se também, em testes utilizando preparação cosmética tópica, com aplicações de duas vezes ao dia, que a quantidade de rugas bem como sua profundidade foram em média 50% menor que os valores iniciais, depois de duas semanas de tratamento, incluindo as rugas na testa, pescoço, mãos e olhos (JACOBS, 2007).

Redução estatística no número de lesões de acne foi observada, durante as primeiras duas semanas de tratamento e estendida por um período de oito semanas.

A utilização em combinação com agentes terapêuticos anti-acne tópicos pode proporcionar benefícios cosméticos para a pele e melhorar a tolerabilidade a diferentes componentes (GREEN et al., 2007; JACOBS, 2007).

A glucosamina e seus metabólitos, também podem ser benéficos em casos de pigmentação excessiva, tais como as manchas de idade, caracterizadas por acúmulo localizado de melanina. A glucosamina atua como um inibidor da ativação da tirosinase, que inibe a produção de melanina, tornando-se útil no tratamento dos distúrbios da hiperpigmentação em geral (KIMBALL et al., 2010; BISSETT, 2009; BISSETT, 2006; SAYO; SAKAI; INOUE, 2004).

A hiperpigmentação é uma condição dermatológica comum que ocorre em todos os tipos de pele, mas é mais proeminente em pele mais escura. A hiperpigmentação pós-inflamatória, melasma e sardas são as discromias mais freqüentemente tratadas e podem ter um impacto psicossocial considerável (ALEXIS; BLACKCLOUD, 2013; WOOLERY-LLOYD; KAMMER, 2011).

A enzima chave limitante na biossíntese de melanina é a tirosinase. Produzida inicialmente na célula como uma pró-enzima inativa, a protirosinase,

tornando-se uma enzima ativa apenas depois de glucosilada. A glucosamina não é um inibidor direto da tirosinase, o mecanismo envolvido é o de inibição do processo de glucosilação enzimática da tirosinase, impedindo assim, a sua ativação e posterior produção de melanina (WOOLERY-LLOYD; KAMMER, 2011; SHATALEBI; MOSTAFAVI; MOGHADDAS, 2010; BISSETT, 2009; BISSETT; FARMER; MCPHAIL, 2007; BISSETT, 2006; IMOKAWA, 1985).

Estudos demonstraram que o NAG mostrou-se efetivo na redução do aparecimento de manchas hiperpigmentadas na pele humana, aplicado topicamente. De acordo com publicações recentes, ao realizar a inibição da glucosilação enzimática, reduz diretamente a produção de melanina (WOOLERY-LLOYD; KAMMER, 2011; SHATALEBI; MOSTAFAVI; MOGHADDAS, 2010; BISSETT et al., 2007a; BISSETT; FARMER; MCPHAIL, 2007).

Em outro mecanismo proposto, em um estudo *in vitro*, observou-se um aumento da expressão de marcadores de diferenciação nos queratinócitos tratados com NAG, tais como queratina-10 e involucrina. A molécula de adesão celular de lectina, a CD44 é também expressa em queratinócitos. Açúcares aminados, tais como o NAG podem ligar-se competitivamente ao CD44, realizando a modulação da adesão celular de queratinócitos (BANDYOPADHYAY, 2009; MAMMONE et al., 2009).

Em três ensaios clínicos recentemente descritos, duplo-cego randomizado em mulheres voluntárias submetidas à administração tópica de 2% N-acetil-glucosamina (NAG), isoladamente e em combinação com niacinamida, observou-se redução considerável na hiperpigmentação na face e no antebraço (WOOLERY-LLOYD; KAMMER, 2011; KIMBALL et al., 2010; BISSETT et al., 2007a; BISSETT, 2006).

As manchas hiperpigmentadas na pele humana começaram a reduzir, após 30 dias de tratamento tópico, com aplicações duas vezes ao dia (JACOBS, 2007).

Além disso, em culturas equivalentes a pele humana, tratadas topicamente com glucosamina e seus derivados, ocorreu redução na produção de melanina, bem como aumento na produção de ácido hialurônico. A análise genômica mostrou a expressão alterada de vários genes relevantes à pigmentação (BISSETT, 2009; OSBORNE; MULLINS; ROBINSON, 2006).

O tratamento do envelhecimento cutâneo utilizando o NAG demonstrou

diminuição de pigmentação, aumento na firmeza e elasticidade da pele, com correspondente aumento de sua espessura (GREEN et al., 2007; GREEN et al., 2004).

Além dos mecanismos acima discutidos, os efeitos anti-inflamatórios relatados das glucosaminas podem estar envolvidos nos benefícios observados para a pele (LOPES JÚNIOR; INACIO, 2013; BISSETT, 2009; BISSETT, 2006).

Com relação a segurança de uso, a grande maioria dos estudos relativos à absorção de glucosamina está relacionada com a administração oral. Cerca de 90% do sulfato de glucosamina administrado por via oral é absorvido (HATHCOCK; SHAO, 2007; JACOBS, 2007; BISSETT, 2006; KANWISCHER et al., 2005; ANDERSON; NICOLOSI, BORZELLECA, 2005).

A administração oral de glucosamina e de seus sais é afetada pelo metabolismo de primeira passagem no fígado. No entanto, uma pesquisa mais recente indica que podem ser metabolizados principalmente no intestino, em vez de exclusivamente pelo fígado (GARNER et al., 2007; AGHAZADEH-HABASHI et al., 2002).

A glucosamina torna-se não-ionizada em pH intestinal, permitindo uma rápida absorção. No entanto, não parece haver transporte intestinal ativo, sendo digerida por bactérias intestinais, ligando-se às lectinas no intestino, e então é excretada nas fezes como um complexo lectina-glucosamina. A excreção é principalmente através da urina e das fezes, onde grande parte da glucosamina exógena, administrada por via oral, é excretada durante os efeitos de primeira passagem (GARNER, 2005).

Estima-se que aproximadamente 87% da dose oral de glucosamina original seja absorvida e posteriormente excretada. De 20% a 30% aparece na urina e cerca de 12% encontra-se amplamente distribuído no organismo, representando a biodisponibilidade sistêmica, e menos de 1% atinge as articulações osteoartíticas (CHEN, 2005; GARNER, 2005; DEAL; MOSKOWITZ, 1999).

A administração oral de glucosamina em doses elevadas (5.000-15.000 mg/kg de peso corporal) é bem tolerado, sem toxicidade documentada. A DL50 para a glucosamina, em vários modelos animais excede a dose de 5.000 mg/kg. A dose diária recomendada de suplementação oral é de 1.500 a 2.000 mg em seres humanos. Assim, a extrapolação dos dados obtidos em estudos com animais e em

estudos toxicológicos *in vitro* sugere que os efeitos adversos são improváveis nos seres humanos (DOSTROVSKY et al. 2011; HATHCOCK; SHAO, 2007; JACOBS, 2007; BISSETT, 2006; ANDERSON; NICOLOSI, BORZELLECA, 2005; GARNER, 2005).

Existia uma hipótese inicial de que a glucosamina poderia aumentar o percurso da hexosamina, sugerindo um potencial efeito adverso sobre a homeostase da glucose, levantando assim a possibilidade de que a glucosamina poderia aumentar o risco de diabetes (ECHARD et al., 2001; KANETO et al., 2001; MONAUNI et al., 2000).

As preocupações levantadas por esta hipótese de um possível efeito adverso conduziram a diversos estudos que, demonstraram que uma dose diária de 1500 mg de cloridrato de glucosamina por 90 dias não produzia alteração sobre a concentração de hemoglobina A1c em indivíduos diabéticos (SCROGGIE, ALBRIGHT, HARRIS, 2003).

Outro estudo foi conduzido, administrando 1.500 mg/dia de sulfato de glucosamina, sobre a glicemia ou insulina no soro em voluntários normais após 12 semanas, onde nenhum dos indivíduos avaliados desenvolveram diabetes durante os ensaios. O efeito colateral mais comumente relatado sobre o sulfato de glucosamina é um limitado desconforto gastrointestinal e alguns casos de flatulência. A partir destes resultados pode-se concluir que o sulfato de glucosamina, bem como seus metabólitos ativos, são seguros para uso a longo prazo, com pouco ou nenhum risco para a saúde, bem como efeitos colaterais adversos (ERHAN et al., 2012; HATHCOCK; SHAO, 2007; PAVELKÁ et al., 2002; MCALINDON et al., 2000).

#### 3.4.3 Doseamento do sulfato de glucosamina (D) (2KCl)

Diversas técnicas foram estudadas para viabilização do doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl), tendo em vista as alternativas disponíveis na literatura, conforme Tabela 1.

TABELA 1 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO CENÁRIO ATUAL DE METODOLOGIAS PARA O DOSEAMENTO DO SULFATO DE GLUCOSAMINA

Artigo	Metodologia	Caracterização	Detector UV	Fase Móvel	Fluxo
(JEANLOZ, 1951)	Oxidação	Oxidação Peroxidativa da Glucosamina e derivados, a partir da utilização de lodo.	NA	NA	NA
(RONDLE, 1955)	Espectro fotômetro Fotoelétrico - UV Vis	Os aminoaçúcares reagem com acetilacetona para formar um material cromogênico - cromóforo ou cromóforos em tratamento em sol. etanólica com ácido p-dimetilaminobenzaldeído.	530nm (visível amarelo)	NA	NA
(LIANG, 1999)	CLAE-UV	Cromatografia de fase reversa usando coluna de pré-derivatização com phenylisothiocyanate	254nm	MeOH:H2O:CH3COOH (10:89,6:0,04)	1,2 ml/min
(ADEBOWALE, 2000)	CLAE-UV	Cromatografia de fase reversa usando coluna de pré-derivatização com phenylisothiocyanate	254nm	MeOH:H2O:CH3COOH	1,2 ml/min
(TYLER, 2002)	CLAE-UV	Coluna C18	195nm	Octane Sulfonic Acid	NA
(AGHAZADEH - HABASHI, 2002)	CLAE-UV	Plasma de Camundongo/Derivatização com sol. 1-naphthyl isothiocyanate/Coluna C18	254nm	Fase Isocrática - ACN: H2O:CH3COOH: triethylamine (4,5: 95,5:0,1:0,05)	0,9 ml/min
(EL-SAHARTY, 2002)	CLAE-IR	Coluna Aminofase e detecção por IR. A curva padrão do sulfato de Glucosamina foi linear ( $r \geq 0,99$ ) em concentrações entre 20 a 1000g.ml <sup>-1</sup> em matérias-primas e formas de dosagem.	IR	ACN:H2O:CH3COOH (50:50:0,02) pH 4.0	NA
(SHAO et al., 2004)	CLAE-UV	Coluna de Phenomenex Luna amino (150mm x 4,6 mm, 5µm de tamanho de partícula)	195nm	Tampão de acetonitrila-fosfato (75:25, v/v, pH 7,50)	1,5 ml/min
(WU, 2005)	Espectro UV-Vis	Reação de ninidrina-glucosamina - Medição por alteração de Coloração	570nm	Monobasic potassium phosphate and NaOH; Polyethylene oxide, HPMC, Natrosol e hydroxyethylcellulose; microcrystalline cellulose	NA
(AMANLOU, 2008)	CLAE-UV	Fase Reversa - Coluna Nucleosil 100 C8 (L7) - 250 mm x 4.6mm 5-µm. Pré-Coluna Derivatização com phenyl isothiocyanate - coluna C18	195nm; 254nm	Fase Isocrática - orthophosphoric acid 0.05% and acetonitrile (60:40, v/v); MeOH:H2O:CH3COOH (10:89,6:0,04; v/v)	0,6 ml/min; 1,2ml/min
(MALLU et al., 2010)	CLAE-UV	Recuperação de 0,9999 e concentração do sulfato de glucosamina em formulação farmacêutica de 84 a 504ug/MI	195nm	Coluna de Fase Reversa C8. Fase Móvel: Tampão Fosfato Acetonitrila	0,6 ml/min;
(NAGARAJAN, 2013)	CLAE-UV	Coluna C18 Extendida (250 x 4.6 mm, com 5 micron)	195nm	Fase Isocrática Octane sulphonic acid in water: Acetonitrile: triethylamine (90.65:8.96: 0.381) -pH 4.0 c/ortho phosphoric acid.	1,0 ml/min

FONTE: O Autor (2015)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1. Reagentes

- Acetona (Merck);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac);
- Ácido cítrico P.A. monoidratado (BIOTEC);
- Água destilada;
- Alginato de sódio - Protanal LF 20 / 40, FMC Bio Polymer, EUA, com viscosidade de 100 a 200 mPas e alto conteúdo de resíduos G (65 – 75%) (Lote 521678);
- Amido solúvel (Biotec, Lote 35576);
- Citrato de sódio diidratado (Cargill);
- Diclorometano (Vetec);
- Gelatina tipo A (Galena, Lote 1183945);
- Glutaraldeído (Sigma Aldrich);
- Goma xantana (Galena, Lote 18989);
- Metabissulfito de sódio (Sigma Aldrich, Lote 607465556P0);
- Metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup> - DEG);
- Miristato de isopropila (Croda, Lote 574222);
- Monoestearato de glicerila (Galena, Lote 14566);
- Óleo de mamona (Rícino) – (FarmanilQuima, Lote F1092013);
- Óleo de semente de uva (FarmanilQuima, Lote: F1172014);
- Óleo mineral puro (vaselina/parafina líquida) – (ISO FAR, Lote 120733);

- Poloxâmoro 407<sup>®</sup>, copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno, de fórmula geral  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ , onde  $a=101$  e  $b=56$ . Peso molecular médio 9840-14.600. Peso molecular porção hidrofóbica 3.386, porcentagem em peso de oxietileno entre 71-75%, EHL 22,0 (Viafarma, Lote WPAG508B);
- Propilparabeno (Nipazol<sup>®</sup> – Vetec);
- Monoestearato de sorbitano, Span 60<sup>®</sup>, EHL 4,7. Surfactante lipofílico não iônico (Lipo do Brasil, Lote H134402);
- Monooleato de sorbitano, Span 80<sup>®</sup>, EHL 4,3. Surfactante lipofílico não iônico (Lipo do Brasil, Lote G268405);
- Sulfato de glucosamina (D) (2KCl) (Sigma , Lote 12030272);
- Sulfato de sódio anidro (Vetec);
- Polissorbato 20, Polioxietileno (20) monolaurato de sorbitano, Tween 20<sup>®</sup>, EHL 16,7. Surfactante hidrofílico não iônico, peso molecular 1227 g/mol (Polytechno, Lote 15764);
- Polissorbato 80, Polioxietileno (20) monooleato de sorbitano, Tween 80<sup>®</sup> EHL 15,0. Surfactante hidrofílico não iônico, peso molecular 1310 g/mol (Emfal, Lote 1249893);

#### 4.1.2 Equipamentos

- Ultrassom Ultra Cleaner 1400 (Unique);
- Ultrassom Soni-tech 8800 (Branson);
- Agitador Mecânico RW20 digital (Ika);
- Termômetro digital (Thermo);
- Analisador de Tamanho de Partícula LS13220 (Beckman Coulter);
- Balança Analítica XS205 Dual Range (Mettler Toledo);
- Micropipeta 1000 – 5000  $\mu\text{L}$  (KASVI);
- Microscópio óptico CX41 (Olympus);

- Banho-Maria (Prolab);
- Agilent 1.200 Series HPLC com Detector de UV;
- Coluna Cromatográfica Eclipse XDB C8 5 $\mu$ m (4,6 x 250nm) PN 990967-906.

## 4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análise preliminar da estabilidade das emulsões primárias A<sub>1</sub>/O preparadas com diferentes óleos e concentração do emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) de 5% e 10% em relação a fase oleosa

A fim de viabilizar o óleo mais adequado para o desenvolvimento da emulsão múltipla, foram realizados testes num total de 10 emulsões A<sub>1</sub>/O, mantendo a concentração fixa do óleo a ser testado, alterando o tipo do óleo e as concentrações do emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) de 5% e 10% em relação a fase oleosa, conforme Tabela 2.

O desenvolvimento das emulsões A<sub>1</sub>/O foi realizado a partir da adição do emulsionante Span 80<sup>®</sup> em 5 mL do óleo selecionado em tubo de ensaio e homogeneizado com bastão de vidro, acrescentando-se 2,5 mL de água destilada e agitado em vórtex por 1 minuto, em método adaptado de Schmidts et al. (2010); Schmidts et al. (2009); Cole e Whateley (1997); Cole e Whateley (1995); Florence e Whitehill (1982).

TABELA 2 - RELAÇÃO DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS A<sub>1</sub>/O DESENVOLVIDAS COM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEOS E EMULSIONANTE SPAN 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) EM CONCENTRAÇÃO DE 5% E 10% EM RELAÇÃO A FASE OLEOSA

Emulsão	Tipo de Óleo	Volume de óleo (mL)	Span 80 <sup>®</sup> (g) (% m/v)	Água (mL)
1	Miristato de isopropila	5,0	0,25 g (5%)	2,5
2	Miristato de isopropila	5,0	0,50 g (10%)	2,5
3	Semente de uva	5,0	0,25 g (5%)	2,5
4	Semente de uva	5,0	0,50 g (10%)	2,5
5	Óleo mineral	5,0	0,25 g (5%)	2,5
6	Óleo mineral	5,0	0,50 g (10%)	2,5
7	Óleo de mamona/rícino	5,0	0,25 g (5%)	2,5
8	Óleo de mamona/rícino	5,0	0,50 g (10%)	2,5
9	Oleato de isodecila	5,0	0,25 g (5%)	2,5
10	Oleato de isodecila	5,0	0,50 g (10%)	2,5

FONTE: O Autor (2015).

4.2.2 Determinação do valor de EHL adequado para a emulsão primária A<sub>1</sub>/O utilizando óleo mineral como fase oleosa e os emulsionantes Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) e Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) em diferentes concentrações

Foi adicionado 0,50 g do sistema emulsionante em 5 mL de óleo mineral, acrescentando-se 2,5 mL de água destilada, gota a gota, agitando-se em vórtex por 1 minuto, conforme Tabela 3.

TABELA 3 - RELAÇÃO DE EHL DAS EMULSÕES A<sub>1</sub>/O TESTADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TENSOATIVOS

Emulsão	Água (mL)	Óleo Mineral (mL)	Span 80 <sup>®</sup>		Tween 80 <sup>®</sup>		EHL
			(g)	(%)	(g)	(%)	
1	2,5	5,0	0,45g	90%	0,05g	10%	5,37
2	2,5	5,0	0,40g	80%	0,10g	20%	6,44
3	2,5	5,0	0,35g	70%	0,15g	30%	7,51
4	2,5	5,0	0,30g	60%	0,20g	40%	8,58

FONTE: O Autor (2015).

O cálculo teórico de EHL das emulsões A<sub>1</sub>/O testadas foi realizado considerando as diferentes proporções de emulsionantes utilizados (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Exemplo: Emulsão 1 – 90% de Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) (0,45g) e 10% de Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) (0,05g):

$$\text{EHL Span 80}^{\text{®}} = 90 \times 4,3 / 100 = 3,87$$

$$\text{EHL Tween 80}^{\text{®}} = 10 \times 15,0 / 100 = 1,50$$

$$\text{EHL Emulsão 1} = 1,50 + 3,87 = 5,37$$

4.2.3 Desenvolvimento da emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> em processo de duas etapas na ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) e utilização do emulsionante Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A<sub>2</sub>)

Preparo da emulsão primária A<sub>1</sub>/O

A fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) foi elaborada utilizando-se 0,10g de Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) e 0,011g (0,15%) de metilparabeno em 2,5 mL de água destilada.

A fase oleosa (O) foi preparada utilizando-se 0,40g de Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) e 0,012g (0,25%) de propilparabeno em 5,0 mL de óleo mineral.

A porcentagem utilizada do metilparabeno foi em relação ao volume final da emulsão primária A<sub>1</sub>/O (7,5 mL) e do propilparabeno em relação ao volume da fase oleosa (5,0 mL).

Preparo da emulsão secundária A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>

A fase aquosa externa (A<sub>2</sub>) foi desenvolvida utilizando-se 0,075g de Tween 80<sup>®</sup> (1,0%); 0,011g de metilparabeno (0,15%) e 0,018g de goma xantana (0,24%) em relação a um volume de 7,5 mL de água destilada constituinte da fase aquosa

externa ( $A_2$ ) e deixado em repouso por 20 minutos até completa hidratação da goma. Estes dados podem ser observados na Tabela 4.

A proporção da fase aquosa interna ( $A_1$ ) (2,5 mL): óleo mineral (O) (5,0 mL) é de 1:2. A proporção da emulsão primária  $A_1/O$  (7,5 mL): emulsão secundária  $A_1/O/A_2$  (7,5mL) é de 1:1.

Para a formação da emulsão múltipla a fase aquosa interna ( $A_1$ ) foi adicionada à fase oleosa (O) e agitada em vórtex por 1 minuto para a formação da emulsão primária  $A_1/O$ . Em seguida foi vertida a fase aquosa externa ( $A_2$ ) na emulsão primária  $A_1/O$  previamente preparada e agitado com bastão de vidro por 5 minutos para a formação da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  em metodologia adaptada de, Schmidts et al. (2010), Schmidts et al (2009), Cole e Whateley (1997), Cole e Whateley (1995), Florence e Whitehill (1982) e Florence e Whitehill (1981).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCL) E DE TAMPÃO CITRATO pH 5,0

Fase	Água (mL)	Óleo Mineral (mL)	Span 80 <sup>®</sup> (g)	Tween 80 <sup>®</sup> (g)	Goma Xantana (g)	Metilparabeno (g)	Propilparabeno (g)
$A_1$	2,5	-	-	0,10	-	0,011	-
O	-	5,0	0,40	-	-	-	0,012
$A_2$	7,5	-	-	0,075	0,018	0,011	-

FONTE: O Autor (2015).

4.2.4 Desenvolvimento da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) e ausência de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna ( $A_1$ ) e utilização do emulsionante Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa ( $A_2$ )

O componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) foi incorporado na concentração de 2% (0,30g) em relação ao volume final do sistema múltiplo  $A_1/O/A_2$  (15,0 mL) na fase aquosa interna ( $A_1$ ) da emulsão primária  $A_1/O$ . Todos os outros

componentes e suas concentrações se mantiveram de acordo com o item 4.2.3, conforme pode ser visto na Tabela 5.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl)

Emulsão	Fase – (A <sub>1</sub> )				Fase –(O)			Fase – (A <sub>2</sub> )			
	Tween 80® (g)	Metilparabeno (g)	Sulfato de Glucosamina (D) (2KCl) (g)	Água (mL)	Span 80® (g)	Propilparabeno (g)	Óleo Mineral (mL)	Tween 80® (g)	Metilparabeno (g)	Goma Xantana (g)	Água (mL)
Branco	0,10	0,011	-	2,5	0,40	0,018	5,0	0,075	0,011	0,018	7,5
Contendo Sulfato de glucosamina (D) (2KCl)	0,10	0,011	0,30	2,5	0,40	0,018	5,0	0,075	0,011	0,018	7,5

FONTE: O Autor (2015).

4.2.5 Desenvolvimento da emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> em processo de duas etapas contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) e utilização do emulsionante Poloxamer 407® (EHL 22,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa (A<sub>2</sub>)

Preparo do sistema tampão citrato pH 5,0

Foi dissolvido 0,98 g de ácido cítrico monoidrato P.A. e 3,52 g de citrato de sódio diidratado em 50 mL de água destilada (FERREIRA, 2002).

Preparo da emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> contendo tampão citrato pH 5,0

A emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> foi preparada com os mesmos componentes e concentrações dos itens 4.2.3 e 4.2.4 apenas substituindo a água destilada da fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) pelo tampão citrato pH 5,0. Uma amostra sem o sistema tampão também foi preparada conforme Tabela 6.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE TAMPÃO CITRATO pH 5 NA FASE AQUOSA INTERNA (A<sub>1</sub>) NA EMULSÃO PRIMÁRIA A<sub>1</sub>/O

Emulsão	FASE (A <sub>1</sub> )					FASE (O)			FASE (A <sub>2</sub> )			
	Tween 80® (g)	Metilparabeno (g)	Sulfato de glucosamina (D) (2KCL) (g)	Água (mL)	Tampão Citrato pH 5 (mL)	Span 80® (g)	Propilparabeno (g)	Óleo Mineral (mL)	Poloxamer 407®(g)	Metilparabeno (g)	Goma xantana (g)	Água (mL)
Ausência de tampão citrato pH 5,0	0,10	0,011	0,30	2,5	-	0,40	0,018	5	0,075	0,011	0,018	7,5
Presença de tampão citrato pH 5,0	0,10	0,011	0,30	-	2,5	0,40	0,018	5	0,075	0,011	0,018	7,5

FONTE: O Autor (2015).

#### 4.2.6 Estudo de estabilidade para o desenvolvimento das formulações

A avaliação das emulsões múltiplas desenvolvidas durante o estudo para incorporação do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) seguiu de acordo com os testes pré-estabelecidos na literatura – Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANDRADE, 2008; MORAIS, 2006; BRASIL, 2004).

A avaliação macroscópica (homogeneidade, características organolépticas) determina inicialmente a estabilidade das amostras preparadas, após um período de 24 horas. Para as amostras macroscopicamente estáveis, realizam-se testes organolépticos e microscópicos nos dias 1°, 7°, 15° e 30° (MORAIS, 2006).

Os parâmetros que geralmente são avaliados foram definidos pelo formulador de acordo com características intrínsecas e específicas da formulação em estudo e dos componentes utilizados na formulação. Em geral, foram avaliadas as características organolépticas que determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor, tais como aspecto, cor, odor e sensação ao tato. Paralelamente se avaliou as características físico-químicas, tais como distribuição e tamanho de partícula e teor de ativo.

#### 4.2.7 Metodologia para o doseamento do sulfato de glucosamina (D) (2KCl)

Diversas técnicas foram estudadas e tendo em vista as alternativas disponíveis conforme Tabela 1, optou-se pela utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para dosear o ativo (MALLU et al., 2010; SHAO et al., 2004).

A metodologia de CLAE utilizada foi uma adaptação à literatura científica (MALLU et al., 2010 SHAO et al., 2004).

Para se preparar a solução padrão foi pesado 200mg de sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e colocado em um balão volumétrico de 50mL (0,40% m/v). Em seguida foi incorporado 25mL de água destilada Milli-Q, sob agitação mecânica e ultrassom, até total dissolução. Por fim foi adicionado 25mL de acetonitrila e levado ao ultrassom por 15 minutos. Filtrou-se com filtro 0,22 $\mu$ m para inserir em um vial de CLAE (MALLU et al., 2010).

As amostras para os testes foram preparadas a partir de 1,0g de emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> desenvolvida no item 4.2.5, adicionado em um balão volumétrico de 50mL. Em seguida foi acrescentado 25mL de água destilada Milli-Q e levado para agitação mecânica e ultrassom até total dissolução. Por fim foi adicionado 25mL de acetonitrila e levado para o ultrassom por 15 minutos. Filtrou-se com filtro 0,22 $\mu$ m para inserir em um vial de CLAE (MALLU et al., 2010).

De acordo com a literatura, a fase móvel utilizada para o doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) deve estar em pH 3,0. Sendo assim, 550mL de água Milli-Q foi ajustado para pH 3,0 com solução de ácido fosfórico (0,5% m/v) e hidróxido de potássio (0,5% m/v), para correção do pH. Posteriormente foi adicionado 450mL de acetonitrila (MALLU et al., 2010).

Para a curva de calibração, foi avaliado o percentual de ativo (2% m/v) que se incorporou no sistema emulsionado, para fixar um valor médio de concentração dentro da curva de calibração e avaliar linearidade e especificidade da metodologia analítica. Estabeleceu-se a concentração média da curva de calibração de 0,400 mg/mL, de acordo com o preparo da amostra teste. Sendo assim, realizou-se diluições da solução padrão (4,0 mg/mL) utilizando balão volumétrico de 10mL, contemplando-se três diluições distintas de 0,200mg/mL, 0,400mg/mL e 0,800mg/mL do analito.

A fim de estressar a metodologia e verificar a qualidade do método proposto, desenvolveu-se uma nova curva de calibração de sete concentrações distintas, variando de 0,1% a 4,0% do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) na formulação, realizando os testes em dias e com analistas diferentes, utilizando a mesma solução padrão com as concentrações de 0,025mg/mL, 0,050mg/mL, 0,100mg/mL, 0,200mg/mL, 0,400mg/mL, 0,600mg/mL e de 0,800mg/mL do analito.

O sistema cromatográfico foi formado pelo equipamento Agilent 1.200 Series HPLC com detector de UV acoplado a um sistema de software para avaliação analítica online, coluna C8 de fase reversa (4.6mm x 250mm, e 5,0 $\mu$ ) e sistema de eluição da fase móvel foi isocrática de água:acetonitrila (55:45 v/v) em pH 3,0 a temperatura ambiente. O fluxo de 0,6mL/min com injeção de 20 $\mu$ L de amostra de 20 $\mu$ L e comprimento de onda de detecção do sulfato de glucosamina (D) (2KCl) de 195 nm.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise preliminar da estabilidade das emulsões primárias A<sub>1</sub>/O preparadas com diferentes óleos e concentração do emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) de 5% e 10% em relação a fase oleosa

Como resultado preliminar verificou-se que o Span 80<sup>®</sup> apresentou boa solubilidade nos óleos testados, sem necessidade de aquecimento.

As emulsões 1 e 2, com miristato de isopropila, formaram um “filme” com óleo na superfície da emulsão após 90 minutos do preparo, mais visível na formulação 1 (ARAUJO, 2013).

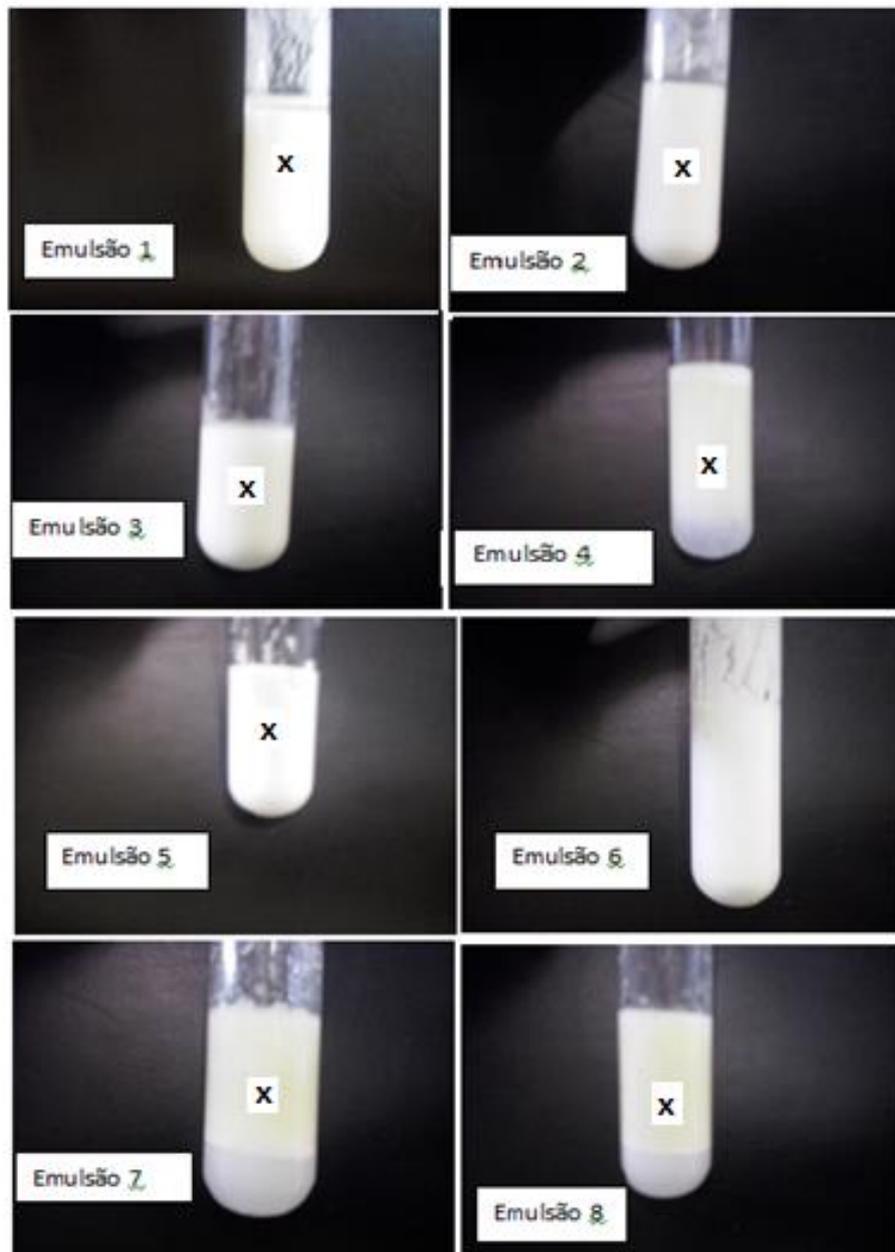
As emulsões 3 e 4, com óleo de semente de uva, contendo 80% de seus ácidos graxos insaturados (ROCKENBACH; RODRIGUEZ; GONZAGA, 2010), iniciaram a separação de fases após 30 minutos, mais visível na emulsão 4.

A emulsão 5, utilizando o óleo mineral, que é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos em maior proporção saturados, ciclo-parafínicos e aromáticos saturados e insaturados (RELE; MOHILE, 2003) com 5% de Span 80<sup>®</sup> separou as fases após 4 horas do preparo, formando um “filme” com óleo na superfície da emulsão, enquanto que a emulsão 6 com 10% de Span 80<sup>®</sup> continuou estável por período de sete dias.

As emulsões 7 e 8, com óleo de mamona, também conhecido como óleo de rícino, caracterizado como um óleo insaturado com 89% de ácido ricinoleico (NETO, 2016), apresentou separação de fases logo após a agitação da emulsão A<sub>1</sub>/O no vórtex.

Das dez opções de emulsões A<sub>1</sub>/O, as emulsões 9 e 10, contendo oleato de isodecila, apresentaram separação de fases logo após o preparo, impossibilitando a continuação dos testes, permanecendo as demais conforme observado na Figura 3.

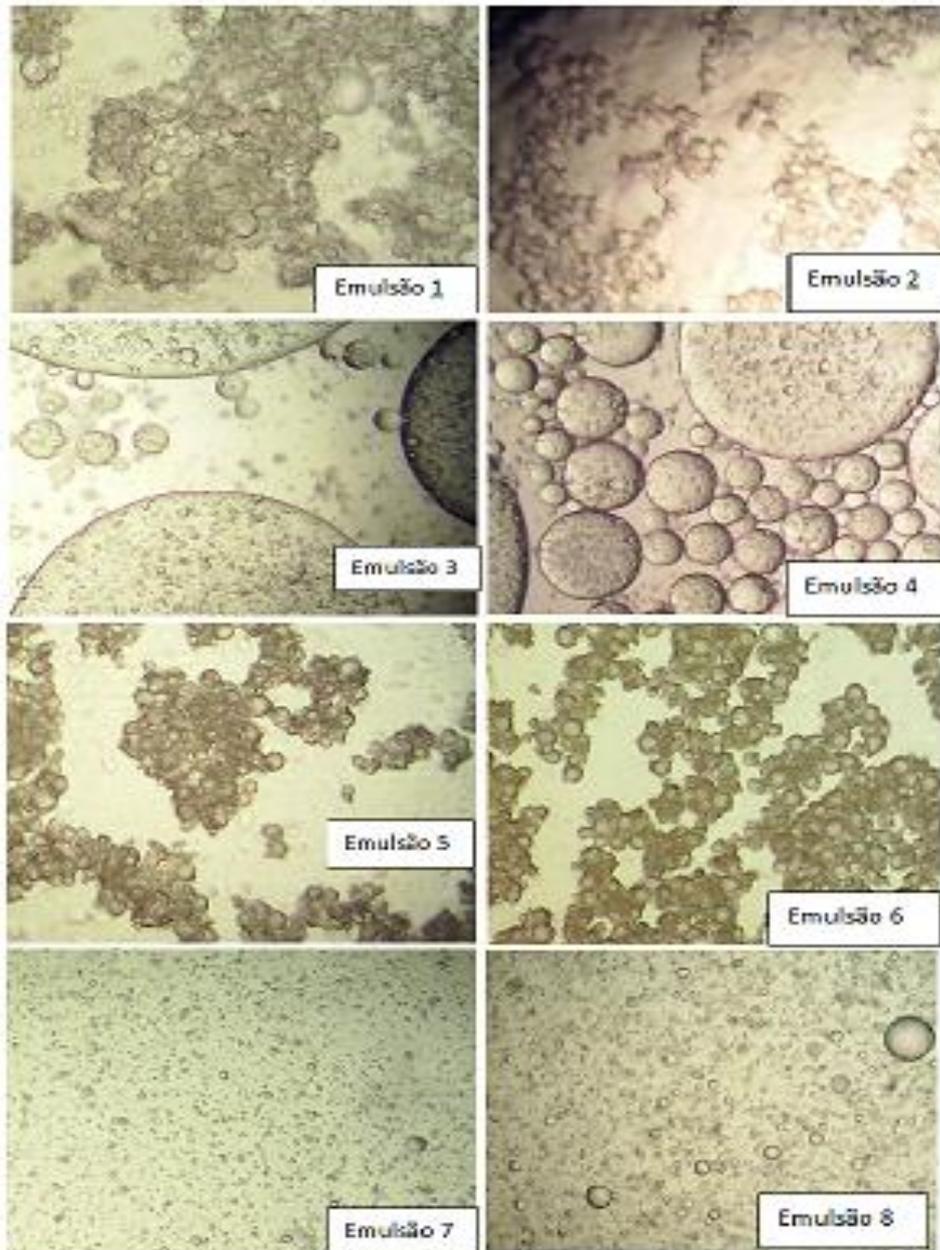
Na Figura 4 pode-se observar o aspecto das emulsões 1 a 8 sob microscopia óptica.

FIGURA 3 - EMULSÕES PRIMÁRIAS A<sub>1</sub>/O ANALISADAS APÓS PREPARAÇÃO

FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Emulsão 1 e 2 contendo miristato de isopropila 5,0 mL, água destilada 2,5 mL (proporção óleo: água de 2:1) e emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) na concentração de 5% para a emulsão 1 e 10% para a emulsão 2, em relação a fase oleosa. As emulsões 3 e 4 foram preparadas com óleo de semente de uva, 5 e 6 com óleo mineral, 7 e 8 com óleo de mamona (rícano) e 9 e 10 com oleato de isodecila (não demonstrado), mantendo-se as mesmas proporções dos outros componentes descritos para as emulsões 1 e 2.

FIGURA 4 – EMULSÕES PRIMÁRIAS A<sub>1</sub>/O ANALISADAS APÓS PREPARAÇÃO SOB MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 100x)



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Emulsão 1 e 2 contendo miristato de isopropila 5,0 mL, água destilada 2,5 mL (proporção óleo: água de 2:1) e emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) na concentração de 5% para a emulsão 1 e 10% para a emulsão 2, em relação a fase oleosa. As emulsões 3 e 4 foram preparadas com óleo de semente de uva, 5 e 6 com óleo mineral, 7 e 8 com óleo de mamona (rícin) e 9 e 10 com oleato de isodecila (não demonstrado), mantendo-se as mesmas proporções dos outros componentes descritos para as emulsões 1 e 2.

Os resultados obtidos demonstraram que as emulsões primárias A<sub>1</sub>/O preparadas com óleo mineral foram as mais estáveis. A emulsão preparada utilizando 10% de emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> permaneceu estável por um período de 7 dias.

Neste período não ocorreu separação de fases nem alteração de cor e odor. Pela observação da Figura 4 em microscopia óptica (aumento de 100 vezes) da emulsão 5 e 6 recém preparada, vemos uma distribuição de tamanho mais uniforme das gotículas de água no óleo, sendo característico de estabilidade de emulsão (ZANIN et al., 2002). Definiu-se, assim, a ordem decrescente de estabilidade das emulsões A<sub>1</sub>/O em relação aos óleos testados: óleo mineral > miristato de isopropila > óleo de semente de uva > óleo de mamona = oleato de isodecila. Estes dados estão de acordo com Cole e Whateley (1995) em referência ao tamanho das gotículas aquosas internas do sistema.

Como para produtos farmacêuticos e cosméticos os hidrocarbonetos refinados como óleo mineral (parafina líquida) e também os óleos de origem vegetal são amplamente utilizados, o resultado obtido está condizente com os citados por Kumar, Kumar e Mahadevan (2012) e Florence e Whitehill (1982) pela observação que os óleos minerais produzem emulsões múltiplas mais estáveis do que as produzidas com óleos vegetais. Este fato deve-se principalmente à composição dos óleos, como presença ou ausência de insaturações, comprimento de cadeia, e presença ou não de ligações ésteres. Todas estas condições influenciam a maior ou menor afinidade relativa do produto para a fase oleosa ou aquosa da emulsão, estabilizando ou desestabilizando o sistema dependente do tipo de emulsão em questão e do emulsionante utilizado.

Sabe-se também que os óleos minerais de viscosidade mais elevada são os que produzem as emulsões múltiplas mais estáveis, pois dificultam ou impedem a difusão de água e substâncias ionizáveis entre as fases aquosas do sistema múltiplo A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> como também a ruptura do filme oleoso (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012; JIGAR et al., 2011; FLORENCE; WHITEHILL, 1982).

Porém, como neste trabalho a emulsão múltipla destina-se a formulação tópica, o óleo mineral de menor viscosidade foi escolhido visando características sensoriais e aceitabilidade do produto por parte do consumidor.

Em relação à concentração utilizada do emulsionante lipofílico Span 80<sup>®</sup> pode-se observar que quando utilizado na concentração de 5% (em relação à fase oleosa) ocorreu separação de fases da emulsão após 4 horas do preparo. Na concentração de 10% (em relação à fase oleosa) a emulsão permaneceu estável por um período de 7 dias. Como as outras variáveis permaneceram inalteradas pode-se

concluir que a percentagem utilizada do emulsionante afetou a estabilidade do sistema. Estes resultados estão de acordo com Kumar, Kumar e Mahadevan (2012) e Florence e Whitehill (1982).

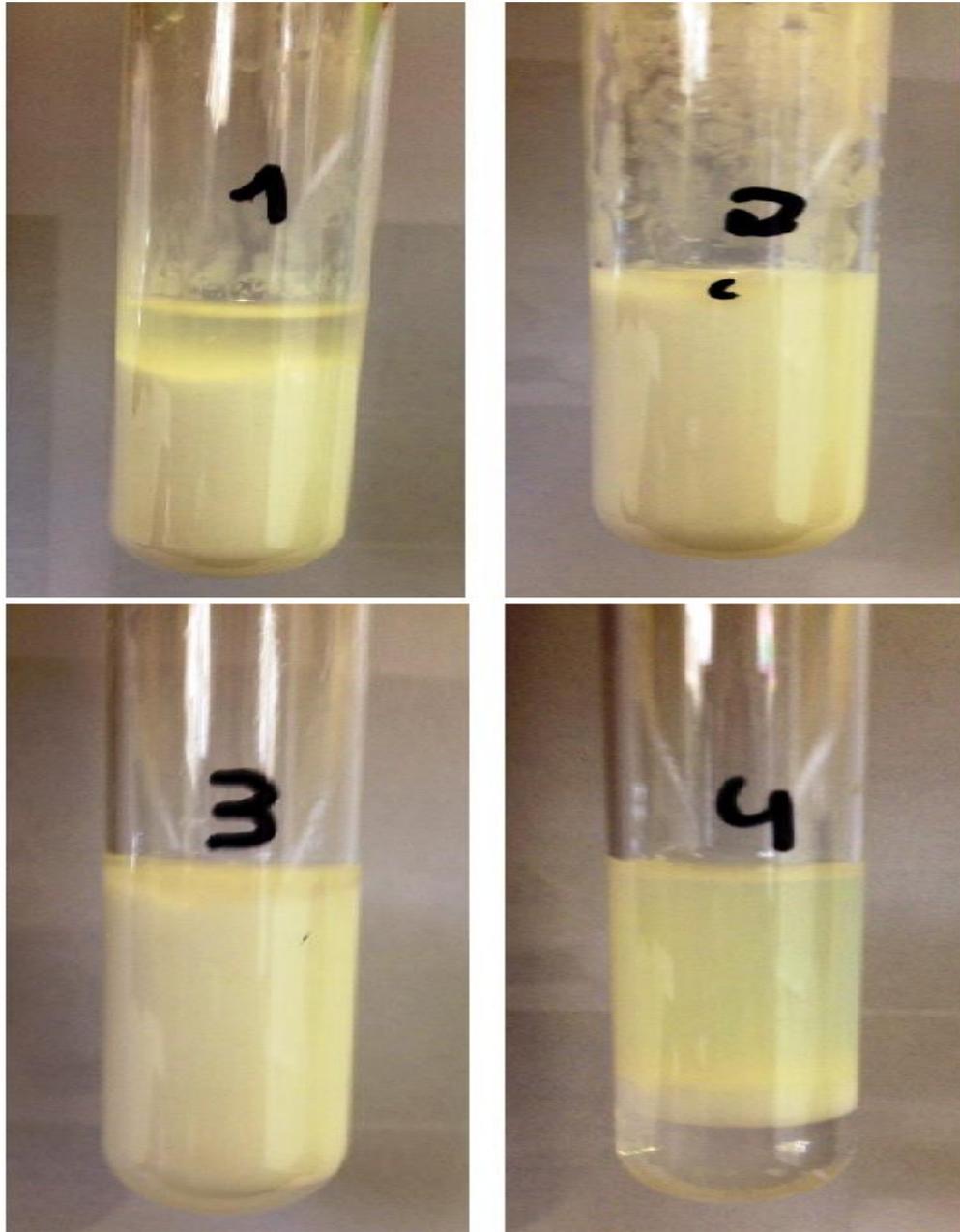
5.2. Determinação do valor de EHL adequado para a emulsão primária A<sub>1</sub>/O utilizando óleo mineral como fase oleosa e os emulsionantes Span 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) e Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) em diferentes concentrações

Como foi verificado, a utilização apenas de Span 80<sup>®</sup> no sistema não foi suficiente para a estabilização da emulsão primária A<sub>1</sub>/O. Assim, uma maneira mais apropriada de estabilizar a emulsão foi a associação do surfactante lipofílico Span 80<sup>®</sup> com o surfactante hidrofílico Tween 80<sup>®</sup>, formando um sistema de emulsionantes.

O Tween 80<sup>®</sup> foi utilizado com o objetivo de melhorar a estabilidade das gotículas de água no interior da emulsão A<sub>1</sub>/O, devido que dois tensoativos com cadeias carbonadas idênticas e, portanto, quimicamente semelhantes, originam emulsões mais estáveis, porque formam uma película mais homogênea ao redor da fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) (ZANIN et al., 2002; GEIGER et al., 1998; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; LACHMAN; LIEBERMAN.; KANIG, 1986).

Após avaliação das emulsões conforme item 4.2.2 com EHL distintos, foi possível verificar que tanto a emulsão 1 de EHL 5,37 como a emulsão 3 de EHL 7,51 e a emulsão 4 de EHL 8,58 apresentaram separação de fases logo após o preparo, conforme pode ser observado na Figura 5.

FIGURA 5 - ESTABILIDADE DAS EMULSÕES PRIMÁRIAS A<sub>1</sub>/O (ÁGUA / ÓLEO MINERAL) COM EHL DISTINTOS UTILIZANDO SPAN 80<sup>®</sup> (EHL 4,3) E TWEEN 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) EM DIFERENTES PROPORÇÕES, OBSERVADAS LOGO APÓS O PREPARO



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Emulsão 1 com EHL 5,37; emulsão 2 com EHL 6,44; emulsão 3 com EHL de 7,51 e emulsão 4 com EHL de 8,58.

Os resultados de estabilidade em 7 dias, por observação visual, evidenciaram que a emulsão 2 de EHL 6,44 apresentou a melhor estabilidade.

Foram realizados testes complementares de EHL confirmando a emulsão de EHL 6,44 como referência de estabilidade (dados não mostrados).

5.3 Desenvolvimento da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  em processo de duas etapas na ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna ( $A_1$ ) e utilização do emulsionante Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa ( $A_2$ )

As características organolépticas identificadas durante o estudo de estabilidade mostraram que a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  desenvolvida conforme item 4.2.3 na ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) apresentou aspecto homogêneo, sem separação de fases, o que se pode observar na Figura 6, nem alteração de cor e odor. A formulação se manteve estável por um período de 20 dias, observando-se a ação da goma xantana na estabilização do sistema, devido a suas características espessantes e de aumento de viscosidade (SCHMIDTS et al., 2009; COLE; WHATELEY, 1997; COLE; WHATELEY, 1995; OMOTOSHO et al., 1986; FLORENCE; WHITEHILL, 1982; FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

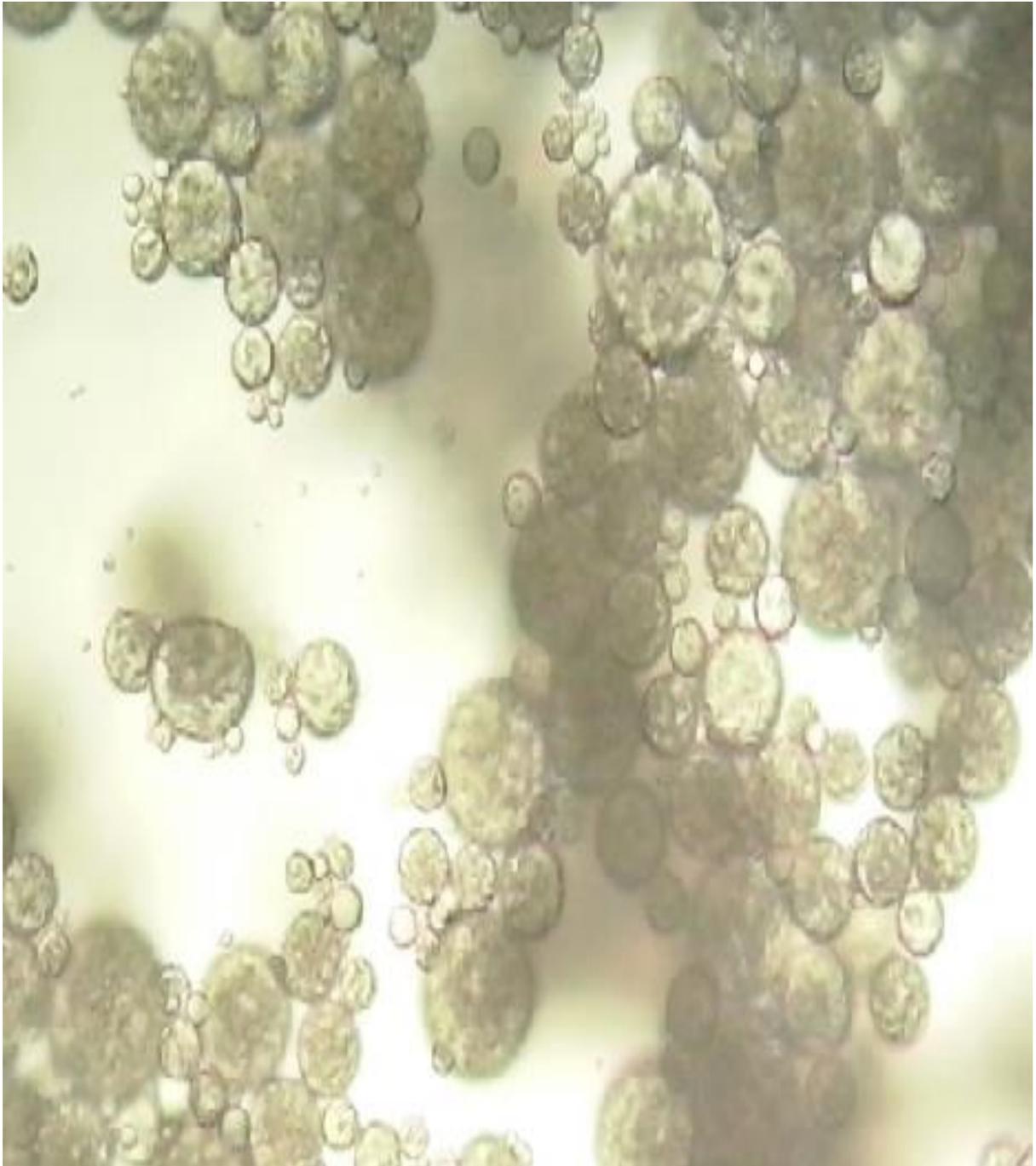
Pode-se visualizar na Figura 7 os glóbulos de óleo dispersos na fase aquosa externa ( $A_2$ ) do sistema múltiplo contendo as gotículas de água dispersas em seu interior.

FIGURA 6 - EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) 20 DIAS APÓS O PREPARO, COM ASPECTO HOMOGÊNEO E SEM SEPARAÇÃO DE FASES



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

FIGURA 7 - EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI), AO MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 200X), 20 DIAS APÓS O PREPARO



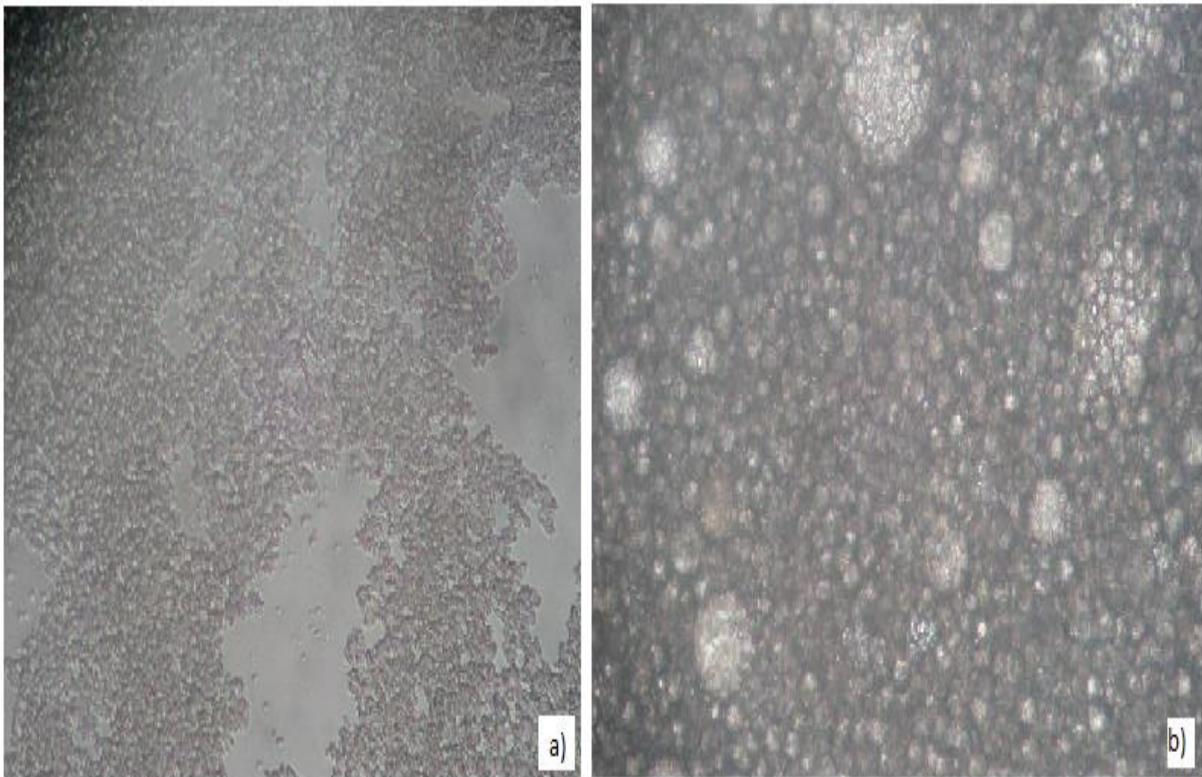
FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Pode-se observar os glóbulos de óleo dispersos na fase aquosa externa ( $A_2$ ) contendo as gotículas de água dispersas no seu interior.

5.4 Desenvolvimento da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) e ausência de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna ( $A_1$ ) e utilização do emulsificante Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa ( $A_2$ )

O estudo comparativo de estabilidade entre a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$ , na presença e ausência do componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) mostrou resultado de estabilidade entre 10 e 15 dias. A análise microscópica decorridas 24 horas do preparo, mostrou que a emulsão múltipla contendo sulfato de glucosamina (D) (2KCl) apresentou glóbulos menores que a emulsão múltipla sem o componente ativo, o que pode ser observado na Figura 8.

FIGURA 8 - MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 20X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  CONTENDO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) (a) E NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO (b)



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Sugere-se que esta redução é devida à migração da água da fase aquosa interna ( $A_1$ ), com a possível perda do sulfato de glucosamina (D) (2KCl) para a fase aquosa externa ( $A_2$ ), através de transporte em micelas mistas e inversas de emulsionantes hidrofóbicos e hidrofílicos em mecanismo que provavelmente ocorre quando existe uma diferença de pressão osmótica entre as duas fases aquosas. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Schmidts et al. (2010), Schmidts et al. (2009), Florence e Whitehill (1982) e Florence e Whitehill (1981).

Com relação aos resultados de distribuição e tamanho de partícula por difração a laser, em triplicata, da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo o sulfato de glucosamina (D) (2KCl) a 2% obteve-se um resultado de 67 nm na caracterização dos glóbulos, e distribuição de 90% da população abaixo de 164 nm.

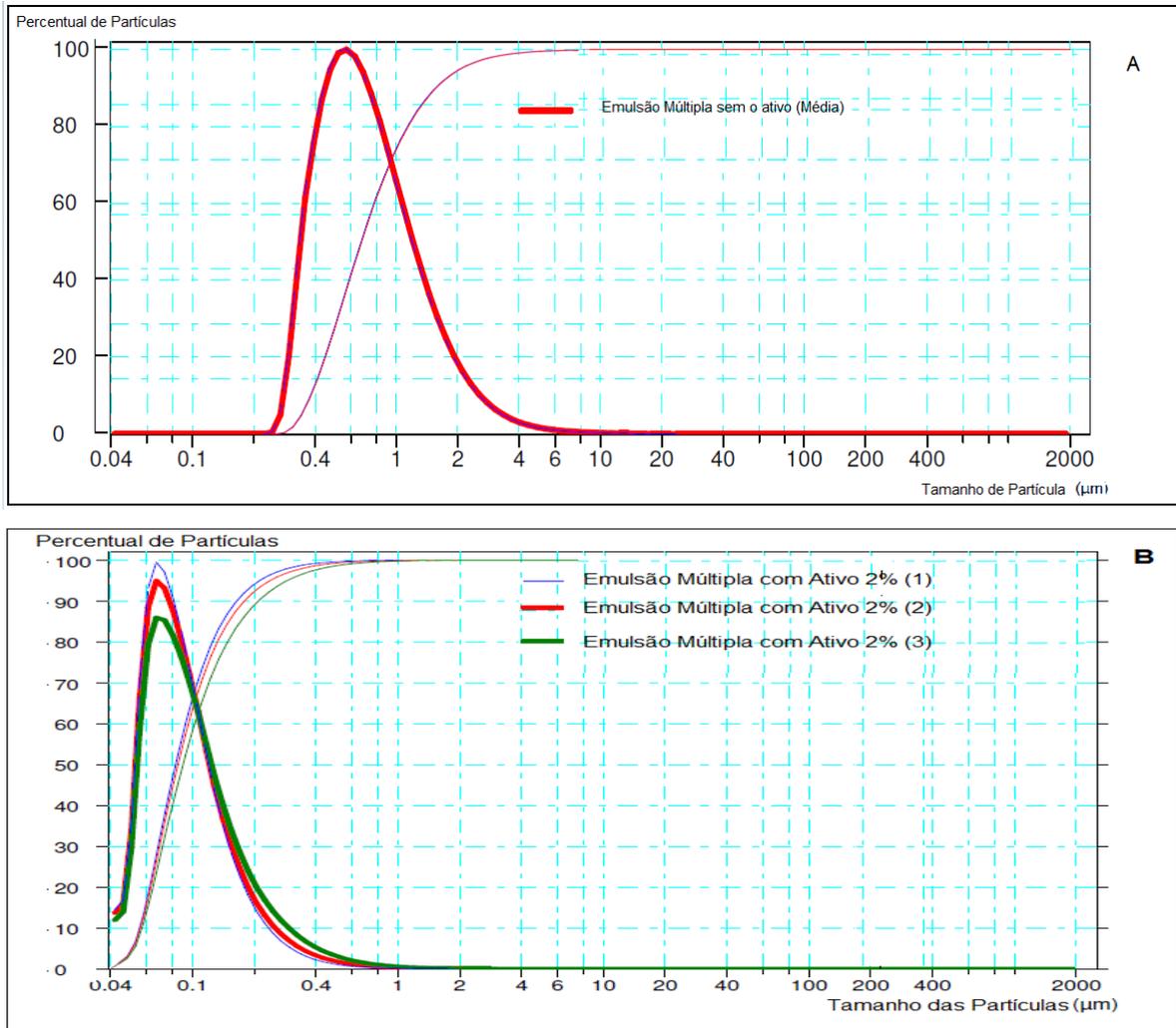
Quando testado a emulsão múltipla sem o componente ativo, observou-se um aumento considerável no tamanho médio do glóbulo, 571nm e distribuição de 90% da população abaixo de 1.558nm, com 50% da população abaixo de 671nm, como pode ser observado na Tabela 7 e Gráfico 1. Estes resultados confirmam o observado na microscopia óptica.

TABELA 7. COMPARAÇÃO DE TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D) (2KCl)

Teste	Tamanho das Partículas	Distribuição das Partículas	
	Moda (nm)	D90 (nm)	D50 (nm)
Emulsão Múltipla sem o componente ativo	571 ± 848	1.558	671
Emulsão Múltipla com o componente ativo	67 ± 100	164	86

FONTE: O Autor (2015).

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS ENTRE A EMULSÃO MÚLTIPLA NA AUSÊNCIA DO COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) (A) E CONTENDO O COMPONENTE ATIVO (B)



FONTE: O Autor (2015).

5.5 Desenvolvimento da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  em processo de duas etapas contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna ( $A_1$ ) e utilização do emulsionante Poloxamer 407<sup>®</sup> (EHL 22,0) e aditivo espessante goma xantana na fase aquosa externa ( $A_2$ )

A glucosamina geralmente é preparada a partir de quitina por hidrólise, usando ácido mineral forte (ácido sulfúrico ou clorídrico) e, durante esta reação, a

quitina é desacetilada e despolimerizada em sal de glucosamina do ácido utilizado (VÁCLAVÍKOVÁ; KVASNIČKA, 2013).

O cloridrato de glucosamina obtido é estável, enquanto que o sulfato de glucosamina não é. É muito higroscópico e degrada-se rapidamente quando exposto a umidade, não sendo vendido comercialmente (VÁCLAVÍKOVÁ; KVASNIČKA, 2013; BAROW; SHAHIDI, 2007).

A maioria das preparações comercialmente disponíveis e vendidas na forma de sulfato de glucosamina são misturas de cloridrato de glucosamina e sulfato inorgânico tal como sulfato de potássio em vez de sulfato de glucosamina.

Apenas alguns são no formato de sal misto, sendo o principal representante um produto de fórmula  $C_6H_{13}Cl_2K_2SO_4$  (BAROW; SHAHIDI, 2007).

Para superar esta desvantagem, o sulfato de glucosamina é feito a partir de cloridrato de glucosamina por co-cristalização com potássio ou sulfato de sódio, para se obter sulfato de glucosamina de 2KCl ou 2NaCl. O conteúdo da base de glucosamina (substância ativa) de cloridrato de glucosamina é de 83% (m/m) de sulfato de glucosamina enquanto 2KCl é somente 59% (m/m). A maioria dos suplementos dietéticos contêm sulfato de glucosamina 2KCl em vez de cloridrato de glucosamina (VÁCLAVÍKOVÁ; KVASNIČKA, 2013).

Qualquer sal de glucosamina é ionizado no estômago e convertido em cloridrato de glucosamina. No intestino delgado o pH é elevado até cerca de 6,8 e uma parte significativa de cloridrato de glucosamina ( $pK_a$  6,91 a 37 °C) é convertida na base livre (BAROW; SHAHIDI, 2007).

Assim, pode-se considerar que a presença do sulfato de glucosamina 2 KCl na fase aquosa interna  $A_1$  da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  possa ocasionar que a água da fase aquosa externa  $A_2$  do sistema emulsionado migre para a fase aquosa interna  $A_1$ , pois a dissociação da substância ativa torna o meio ionizado e uma pressão osmótica surge em decorrência, atraindo mais água à fase aquosa interna ( $A_1$ ) do sistema. Deste fato resulta um acréscimo no tamanho das gotículas da fase aquosa interna  $A_1$  o que pode vir a desestabilizar o sistema, causando até uma separação de fases.

A maior parte das formulações contendo sulfato de glucosamina no mercado é sob a forma oral e uma formulação alternativa, tal como um sistema de distribuição

transdérmico seria interessante, a fim de aumentar as opções de uso pelos pacientes (KANWISCHER et al., 2005).

Foram avaliadas a estabilidade físico-química do sulfato de glucosamina e a permeação na pele de rato. O sulfato de glucosamina em diferentes valores de pH mostrou maior estabilidade em pH 5,0. A degradação é mais rápida com o pH aumentado e a estabilidade diminui com o aumento da temperatura (KANWISCHER et al., 2005).

Devido à sua característica relativamente hidrofílica, era esperado baixa permeação do sulfato de glucosamina na pele, com o valor de log P calculado de -2,375, considerando que o log P da maior parte das substâncias ativas de possível uso dermatológico, são conhecidas como sendo na faixa de 2 a 4. No entanto, a taxa de permeação foi determinada como sendo  $13,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-1}$  a uma concentração de 5%. Os resultados deste estudo sugerem a possibilidade de desenvolver um sistema transdérmico com sulfato de glucosamina (KANWISCHER et al., 2005).

A instabilidade de sistemas emulsionados pode ser definida pela perda na viscosidade, separação de fases ou inversão de fases (SCHMIDTS et al., 2010). Assim, a substituição do emulsionante não iônico hidrofílico Tween 80<sup>®</sup> (EHL 15) pelo emulsionante não iônico polimérico anfifílico Poloxamer 407<sup>®</sup> (EHL 22) teve como objetivo fornecer melhor estabilidade ao sistema múltiplo  $A_1/O/A_2$  na fase aquosa externa ( $A_2$ ). Esta fase também foi acrescentada de goma xantana, aditivo espessante e estabilizante de alto peso molecular e, devido ao caráter aniônico, otimiza a sua hidratação. A presença do emulsionante polimérico anfifílico e da goma na fase aquosa externa ( $A_2$ ) pode influenciar o sistema emulsionado favoravelmente, pelo provável aumento na adsorção na interface, quando a fase oleosa possuir um emulsionante lipofílico de peso molecular pequeno como o Span 80<sup>®</sup>. A presença da goma xantana, devido à interface com a camada oleosa contendo o emulsionante lipofílico, origina certa interação interfacial estabilizadora, acarretando possível restrição na migração dos emulsionantes e eletrólitos entre as fases do sistema múltiplo (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAM, 2012; SCHMIDTS et al., 2010; COLE; WHATELEY, 1995; OMOTOSHO, 1990).

Uma outra possível maneira de diminuir a instabilidade da emulsão é com a utilização de um sistema tampão na fase aquosa interna ( $A_1$ ). Uma solução tampão

é uma solução cujo pH varia pouco quando pequenas quantidades de cátions ( $H_3O^+$ ) ou ânions ( $OH^-$ ) são adicionados na solução.

Em geral, os tampões são formados por um ácido e sua base conjugada em concentrações aproximadamente iguais (ex: ácido cítrico e citrato de sódio).

Quando adicionamos ânions ( $OH^-$ ) no tampão vai ocorrer consumo de ácido formando uma base, que por hidrólise, recompõe o ácido consumido. Assim o pH da solução permanece equilibrado.

Da mesma forma quando adicionamos um cátion ( $H_3O^+$ ) na solução, vai consumir a base conjugada. Simultaneamente o ácido gerado vai hidrolisar gerando base, assim mantendo o pH relativamente estabilizado.

O ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) é usado normalmente em alimentos e na área cosmética como antioxidante e acidulante e o citrato de sódio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) também é bastante usado em alimentos como estabilizante, anticoagulante, formando quelatos com cálcio.

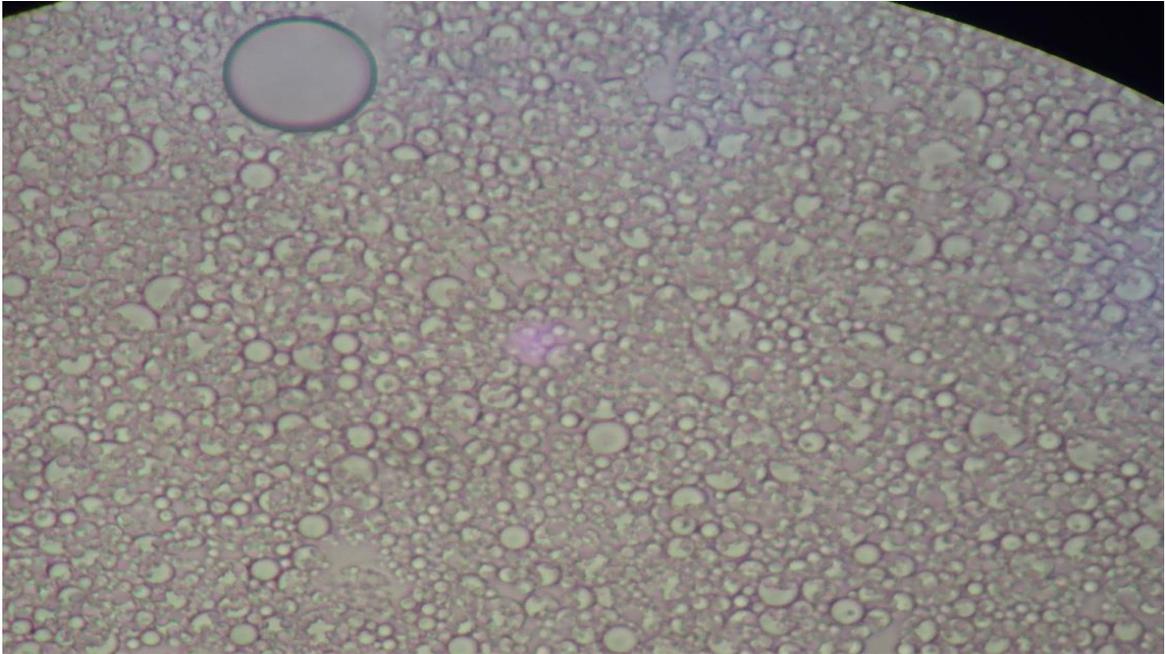
Avaliando os trabalhos de Schmidts et. al.(2010) e de Kanwisher et al.(2005) foi considerado a possibilidade de uso de um tampão com pH 5,0 de ácido cítrico/citrato de sódio na fase aquosa interna ( $A_1$ ) para estabilizar a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$ . Os resultados de estabilidade da emulsão múltipla foram promissores.

É sugerido que a ação do tampão envolva a estabilidade do meio devido a menos íons livres e conseqüentemente menor migração de água da fase aquosa externa  $A_2$  para a fase aquosa interna  $A_1$ , preservando o equilíbrio do sistema emulsionado.

Resultados comparativos das formulações da Tabela 6 mostraram que a emulsão  $A_1/O$  preparada na ausência de tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna ( $A_1$ ) apresentou viscosidade aparentemente menor que a emulsão contendo tampão citrato pH 5,0 onde ocorreu separação de fases após 24 horas.

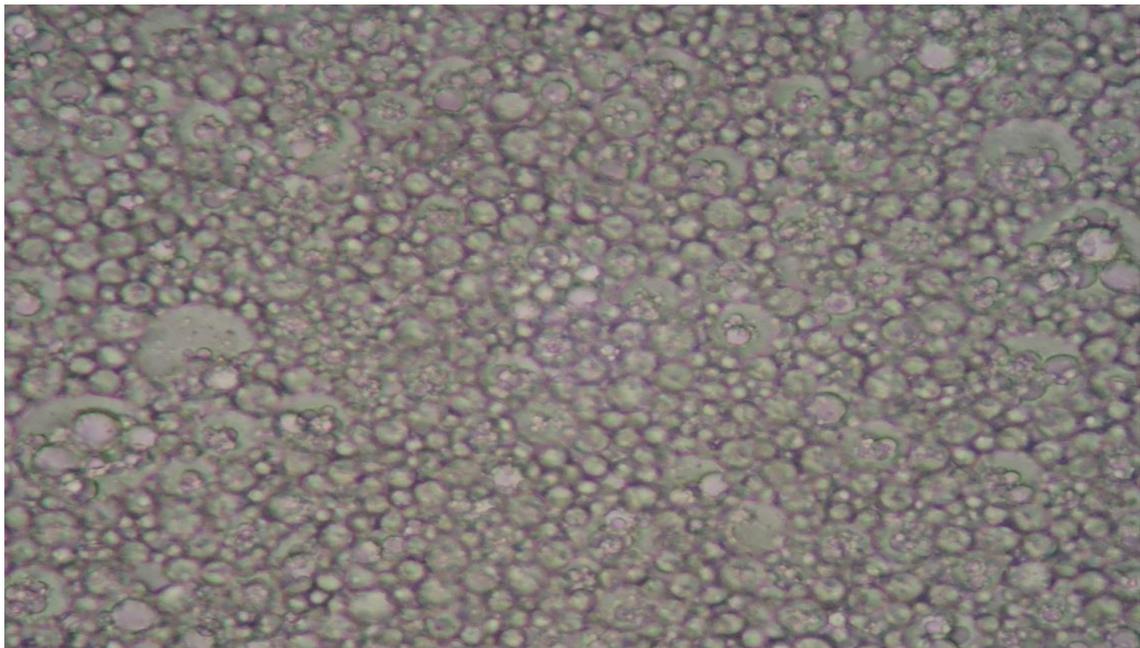
A partir da análise microscópica foi possível observar que a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna  $A_1$ , após 24 horas, apresentou gotículas menores e mais uniformes. No mesmo intervalo de tempo a emulsão múltipla na ausência do sistema tamponante, apresentou gotículas maiores e mais irregulares, como pode ser observado nas Figuras 9 e 10.

FIGURA 9 – MICROSCOPIA OPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) E TAMPÃO CITRATO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA ( $A_1$ ), APÓS 24 HORAS



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

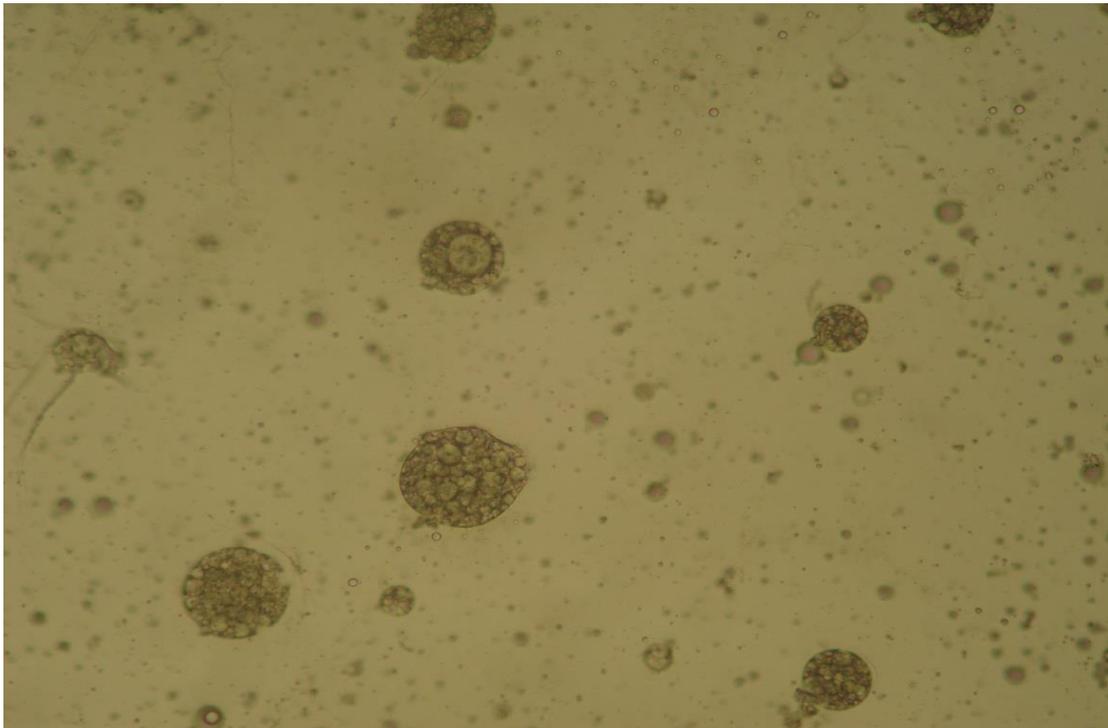
FIGURA 10 – MICROSCOPIA OPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCL) E AUSÊNCIA DE TAMPÃO CITRATO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA ( $A_1$ ), APÓS 24 HORAS



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Durante os primeiros 15 dias do estudo de estabilidade, a emulsão múltipla na ausência do sistema tamponante na fase aquosa interna ( $A_1$ ), apresentou a mesma característica inicial de gotículas maiores, irregulares e foi possível visualizar indícios de coalescência, como pode ser observado na Figura 11.

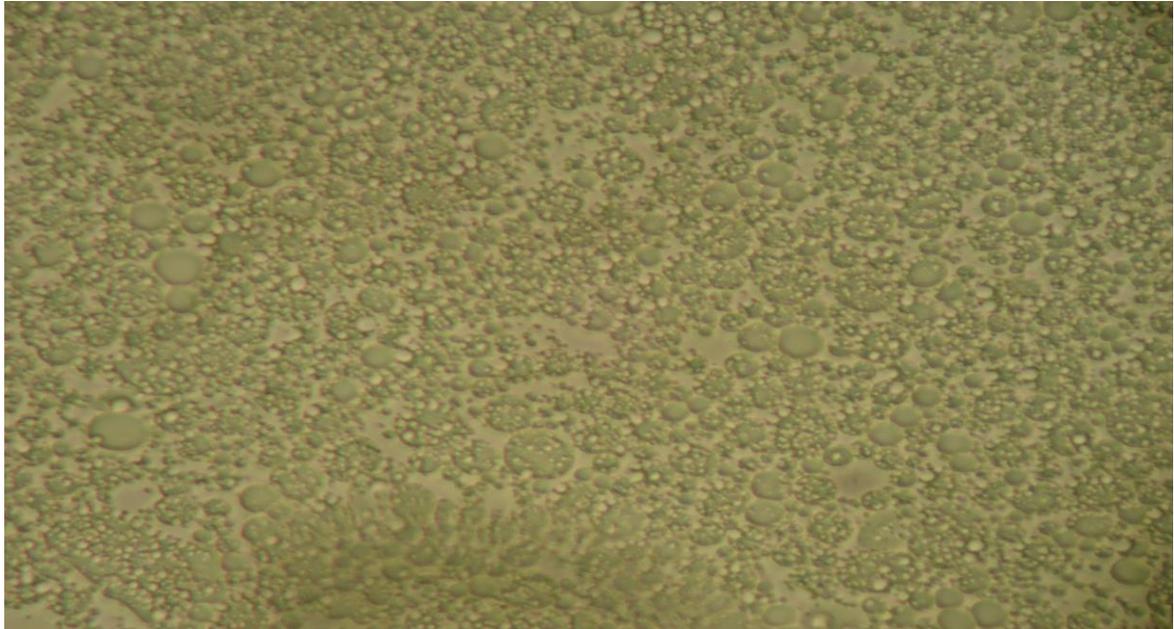
FIGURA 11 – MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D) (2KCl) E AUSÊNCIA DE TAMPÃO pH 5,0 NA FASE AQUOSA INTERNA ( $A_1$ ), APÓS 15 DIAS DE PREPARO



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Neste mesmo período de 15 dias de observação de estabilidade a emulsão múltipla contendo tampão citrato pH 5,0 apresentou avaliação microscópica semelhante da realizada 24 horas após o preparo, não sendo verificadas alterações significativas em seu aspecto, como pode ser visualizado na Figura 12. A emulsão com o tampão pode ser considerada mais estável, homogênea e com glóbulos menores.

FIGURA 12 – MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) E TAMPÃO CITRATO pH 5 NA FASE AQUOSA INTERNA A<sub>1</sub>, APÓS 15 DIAS DE PREPARO



FONTE: O Autor e Lazinski, L.M. (2015).

Como resultado satisfatório do estudo de estabilidade, a emulsão múltipla contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (K)(2KCl) e tampão citrato pH 5,0 na fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) permaneceu estável por 30 dias, sem separação de fases ou alteração de cor e odor.

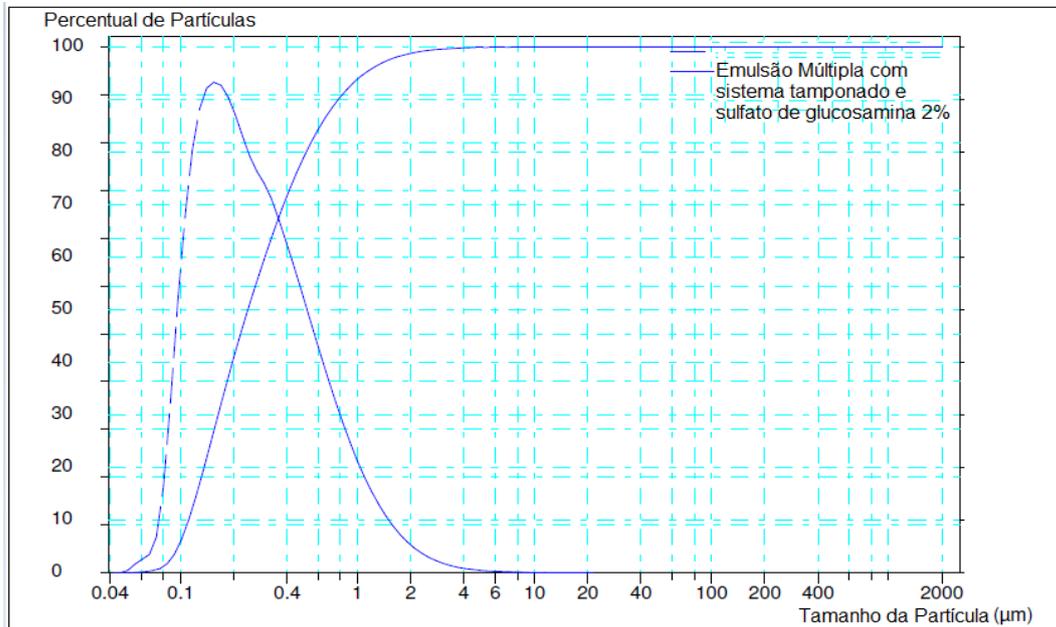
Em relação ao estudo do tamanho da partícula das emulsões múltiplas contendo o componente ativo e o sistema tamponante, constatou-se que o tamanho médio de partícula foi de 384nm, com distribuição de 70% das partículas com tamanho abaixo de 400 nm, como pode ser avaliado através da Tabela 8 e Gráfico 2.

TABELA 8. TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> CONTENDO O COMPONENTE ATIVO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) E TAMPÃO CITRATO pH 5,0

Teste	Tamanho das Partículas	Distribuição das Partículas	
	Moda (nm)	D90 (nm)	D70 (nm)
Emulsão múltipla tamponada com ativo 2%	384 ± 155	779	400

FONTE: O Autor (2015).

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA EMULSÃO MÚLTIPLA COM SISTEMA TAMPONADO E SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) A 2% APÓS 15 DIAS DE PREPARO



FONTE: O Autor (2015).

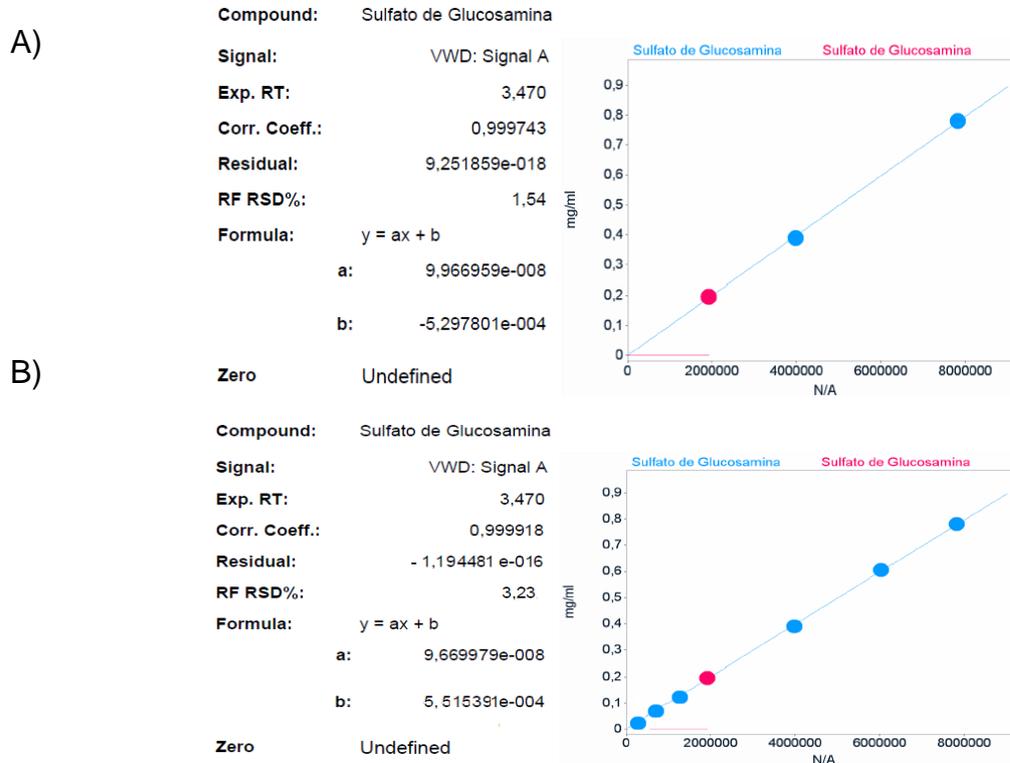
### 5.6 Metodologia para doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl)

Com o resultado favorável de estabilidade da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  com o componente ativo incorporado na fase aquosa interna ( $A_1$ ) e sistema tampão citrato pH 5,0, realizou-se os testes de doseamento do ativo, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com a metodologia adaptada de Mallu et al. (2010) e Shao et al.(2004), foi feita a verificação da especificidade do ativo em um comprimento de onda determinado.

A curva de linearidade do método, apresentou coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) de 0,999 em uma curva preliminar de 3 pontos e confirmado o mesmo valor de ( $R^2$ ) numa segunda curva de sete pontos (Figura 13) para dosear o sulfato de glucosamina (D)(2KCl) em concentrações na faixa de 0,10% a 4,00% (m/v) na formulação.

FIGURA 13 - CURVA DE CALIBRAÇÃO COM TRÊS CONCENTRAÇÕES (A) E DE SETE CONCENTRAÇÕES (B) DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI)

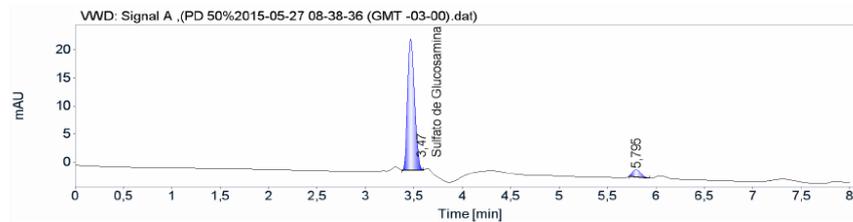


FONTE: O Autor (2015).

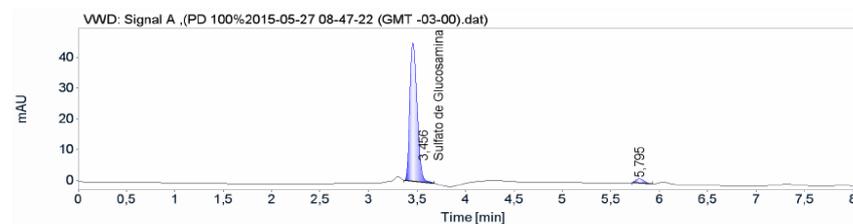
O doseamento por CLAE foi realizado em dias distintos, por diferentes analistas e apresentou repetibilidade e reprodutibilidade. Conforme os dados gerados, o sulfato de glucosamina (D)(2KCI) apresentou tempo de retenção de 3,5 minutos, correspondendo com dados da literatura (MALLU et al., 2010). O resultado cromatográfico obtido com o ativo detectado e específico está mostrado na Figura 14, referente aos três pontos de concentração preliminares.

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA COM O PICO DO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl), SENDO ESPECÍFICO E DETECTÁVEL NA CURVA DE CALIBRAÇÃO PRELIMINAR

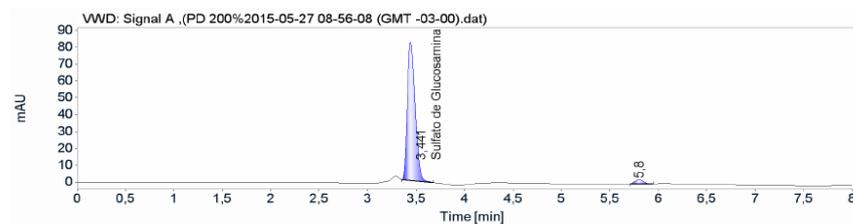
Nome Amostra:	Massa Amostra	Unidade Massa	Multiplicador * Diluição	Arquivo Dados	Localização	Nível Cal.
PD 50%	1,0000	mg	1,00	PD 50%2015-05-27 08-38-36 (GMT -03-00).dat	Vial 1	1



Nome Amostra:	Massa Amostra	Unidade Massa	Multiplicador * Diluição	Arquivo Dados	Localização	Nível Cal.
PD 100%	1,0000	mg	1,00	PD 100%2015-05-27 08-47-22 (GMT -03-00).dat	Vial 2	2



Nome Amostra:	Massa Amostra	Unidade Massa	Multiplicador * Diluição	Arquivo Dados	Localização	Nível Cal.
PD 200%	1,0000	mg	1,00	PD 200%2015-05-27 08-56-08 (GMT -03-00).dat	Vial 3	3



FONTE: O Autor (2015).

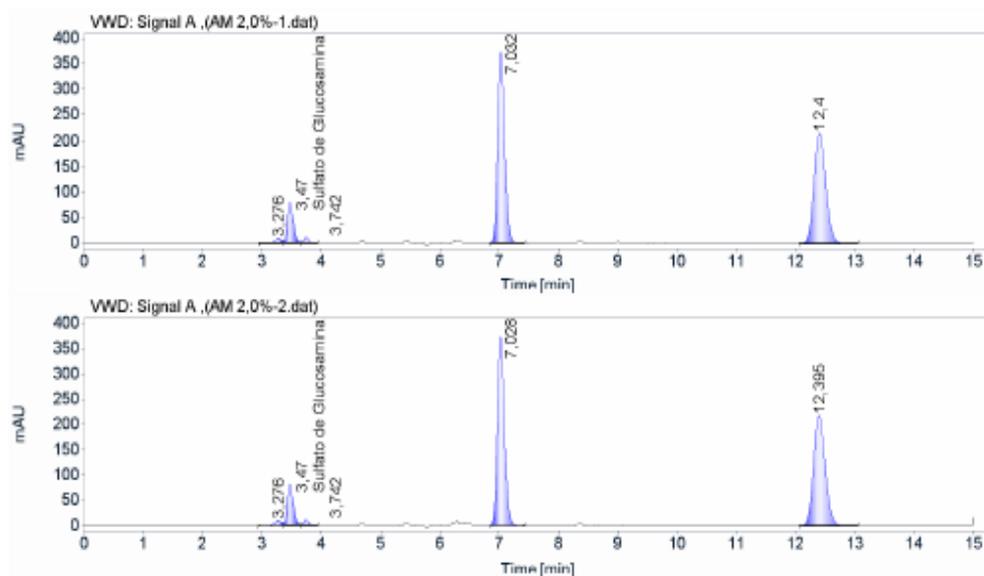
Assim, foi utilizado esta metodologia para avaliar a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  com 2% de sulfato de glucosamina (D)(2KCl) na fase aquosa interna ( $A_1$ ), sendo possível diagnosticar que o método foi efetivo e detectou com exclusividade no tempo de retenção de 3,5 minutos o pico característico do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) conforme Figura 15. Como marcadores adicionais, foram considerados os conservantes da formulação com o metilparabeno e o propilparabeno com tempo de retenção de 7 min.e 12,5 min. respectivamente.

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DE EMULSÃO MÚLTIPLA CONTENDO SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCl) A 2% (m/v)

**Sequência:** 20150617RT2.rst  
**Nome do Projeto:** GLUCOSAMINA  
**Método:** GLUC-NH2 - TAMPAO-ACN - pH3,0-2.met  
**Tipo Amostra:** Sample **Nível Calibração:**  
**Volume da injeção:** 10,000 **Diluição:** 2  
**Data da injeção:** 17/6/2015 17:08:56  
**Equipamento:** S-L-CM-011  
**Coluna Cromatográfica:** Coluna 19 - Supelcosil LC-18-DB, 4,6 x 250mm, 5um  
**Número de Série:** 107325-01 Lot: 5575

### Resumo Amostras

Nome Amostra:	Massa Amostra	Unidade Massa	Multiplicador * Diluição	Arquivo Dados	Localização	Nível Cal.
AM 2,0%-1	521,9000	mg	50,00	AM 2,0%-1.dat	9	
AM 2,0%-2	521,9000	mg	50,00	AM 2,0%-2.dat	9	



FONTE: O Autor (2015).

Consideradas a curva de calibração e a corrida cromatográfica robusta e sustentável, o sulfato de glucosamina (D)(2KCl) na emulsão foi quantificado conforme Figura 16, apresentando resultado médio de recuperação de 2,17% para um valor teórico de 2% (m/v) na formulação. Conclui-se que o sistema cromatográfico é satisfatório para doseamento do sulfato de glucosamina (D)(2KCl) em emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>.

FIGURA 16- RESULTADO DA CORRIDA CROMATOGRÁFICA DA AMOSTRA DA EMULSÃO MÚLTIPLA COM SULFATO DE GLUCOSAMINA (D)(2KCI) A 2%

### Estadística das Amostras

Composto: Sulfato de Glucosamina Sinal: VWD: Signal A, 195 nm

Nome Amostra:	Tipo	TR [min]	Área	Altura	Peak Resolution USP	Tail F.	Amount
AM 2,0%-1	VV	3,47	9390631	1355589	1,06	0,00	2,16%
AM 2,0%-2	VV	3,47	9456799	1367079	1,06	0,00	2,18%
				Média	1,06	0,00	2,17%
				Desvio padrão			0,0001
				RSD			0,4962

FONTE: O Autor (2015).

## 6 CONCLUSÃO

As emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) devido à complexidade de sua estrutura não são sistemas estáveis. Para estabilizar este sistema contendo o componente ativo sulfato de glucosamina (D)(2KCl), foram considerados alguns fatores específicos, como a natureza da fase oleosa, a escolha dos emulsionantes e dos aditivos estabilizantes.

A emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  permaneceu estável por 30 dias, com a utilização de sistema emulsionante lipofílico e hidrofílico a base de ésteres de sorbitano com EHL 6,44 para estabilizar a emulsão primária  $A_1/O$ , onde foi utilizado óleo mineral. A fase aquosa interna ( $A_1$ ) contendo o componente ativo e sistema tampão citrato pH 5,0 foi estabelecida para agregar manutenção do equilíbrio osmótico e evitar perda de água e do ativo para a fase aquosa externa ( $A_2$ ), composta de tensoativo polimérico anfifílico e goma xantana, aditivo espessante e estabilizante de natureza aniônica, com capacidade de retenção de água. A composição da fase aquosa externa ( $A_2$ ) desempenha atividade na adsorção do tensoativo monomérico lipofílico e certo reforço na interface do sistema e na manutenção do equilíbrio osmótico.

O desenvolvimento do sistema emulsionado múltiplo com o componente ativo foi satisfatório para a incorporação e uso pretendido do sulfato de glucosamina (D)(2KCl), que é relativamente hidrofílico e com certa instabilidade. Com a formulação estabilizada, foi possível visualizar a aplicação do ativo topicamente, visando ação nas camadas mais externas da pele, atuando na hidratação cutânea e na redução de discromias.

A metodologia analítica para doseamento do ativo na formulação mostrou-se adequada para o propósito, com resultado satisfatório, com especificidade ( $t=3,5\text{min}$ ) e linearidade ( $R^2= 0,999$ ), podendo dosear o sulfato de glucosamina (D)(2KCl) num intervalo de 0,1 a 4,0% em um sistema emulsionado múltiplo.

## REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, A. O.; COX, D.S.; LIANG, Z.; EDDINGTON, N. D. Analysis of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Content in Marketed Products and the Caco-2 Permeability of Chondroitin Sulfate Raw Materials. **JANA**, v.3 (1): p. 37-44, 2000.
- AGHAZADEH-HABASHI, A.; SATTARI, S.; PASUTTO, F.; JAMALI, F. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.5(2), p.181-184, 2002.
- AGRAWAL, A.; KULKARNI, S.; SHARMA, S.B. Recent advancements and applications of multiple emulsions. **International Journal of Advances in Pharmaceutics**, ISSN: 2320-4923, Vol. 4 Issue 6, p.94-103, 2015.
- AKHTAR, N.; AHMAD, M.; KHAN, H.M.; GULFISHAN, A.J.; MAHMOOD, A.; UZAIR, M. Formulation and characterization of a multiple emulsion containing 1% l-ascorbic acid. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v.24(1): p.1-10, 2010.
- ALEXIS, A. F.; BLACKCLOUD, P. Natural ingredients for darker skin types: growing options for hyperpigmentation. **Journal Drugs Dermatology**, v.12(9 Suppl), p.123-127, 2013.
- ALMADA, A.L. Glucosamine Shell Game Revisited. In: **Functional Foods and Nutraceuticals**, 2003.
- ALVAREZ-ROMÁN, R; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Control Release**, v.14:99(1), p.53-62, 2004.
- AMANLOU, M. Investigation on Counterfeit Glucosamine and Chondroitin Products in Iranian Pharmaceutical Markets. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.7(2), p.123-129, 2008.
- AMID, B. T.; MIRHOSSEINI, H. Stabilization of water in oil in water (W/O/W) emulsion using whey protein isolate-conjugated durian seed gum: Enhancement of interfacial activity through conjugation process. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v.113, p.107-114. 2014.
- ANDERSON, J.W., NICOLOSI, R.J., BORZELLECA, J.F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p. 187-201, 2005.
- ANDRADE, F. F. de. Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico. 151 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2008.
- ANGELOVA-FISCHER, I.; DAPIC, I.; HOEK, A.K.; JAKASA, I. FISCHER, T.W.;

ZILLIKENS, D.; KEZIC, S. Skin Barrier Integrity and Natural Moisturising Factor Levels After Cumulative Dermal Exposure to Alkaline Agents in Atopic Dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v.94: p. 1-5, 2014.

ARAÚJO, M.M. Preparação e Caracterização de Sistemas Emulsionados Lipídicos contendo Praziquantel. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN**, Natal, 2013.

BANDYOPADHYAY, D. Topical treatment of melasma. **Indian Journal of Dermatology**, v.54(4), p.303–309, 2009.

BAROW, C.; SHAHIDI, F. Marine nutraceuticals and functional foods. **CRC Press**. 512, p.215-216, 2007.

BASSLEER, C., COMBAL, J., BOUGARET, S. & MALAISE, M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 beta on human articular chondrocytes cultivated in clusters. **Osteoarthritis Cartilage**, p.196–204, 1998.

BAUMANN, L. **Dermatologia Cosmética – Princípios e Prática**. Livraria e Editora Revinter Ltda. ISBN: 85-7309-858-9, p.11, 2004.

BECKER, C. L.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; KLAASSEN, C. D.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. **International Journal of Toxicology**, v.28(4S), p.5-67, 2009.

BECKMAN, COULTER. LS™ 13 320 MW. Disponível em: [https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?\\_nfpb=true&\\_windowLabel=UCM\\_RENDERER&\\_urlType=render&wlpUCM\\_RENDERER\\_path=%252Fwsr%252FIndustrial%252Fproducts%252Fflaser-diffraction-particle-size-analyzers%252FIs-13-320-mw%252Findex.htm](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDERER&_urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%252Fwsr%252FIndustrial%252Fproducts%252Fflaser-diffraction-particle-size-analyzers%252FIs-13-320-mw%252Findex.htm). Acessado em Fevereiro de 2016.

BIGGEE, B.A.; BLINN, C.M.; MCALINDON, T.E.; NUIE, M.; SILBERT, J.E. Low levels of human serum glucosamine after ingestion of glucosamine sulphate relative to capability for peripheral effectiveness. **Annual Rheumatism**, v.65: p.222-226, 2006.

BISSETT, D. L.; ROBINSON, L. R.; RALEIGH, P. S.; MIYAMOTO, K.; HAKOZAKI, T.; LI, J.; KELM, G. R. Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation by topical N-acetyl glucosamine. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.6(1), p.20-26, 2007a.

BISSETT, D.L.; FARMER, T.; MCPHAIL, S. Genomic expression changes induced by topical N-acetyl glucosamine in skin equivalent cultures in vitro. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.6, p.232-238, 2007.

BISSETT, D.L. Glucosamine: an ingredient with skin and other benefits. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.5, p.309–315, 2006.

BISSETT, D.L. Common cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v.27, p.435–445,

2009.

BONTE, F. Skin moisturization mechanisms: New data. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.69, p.135-141, 2011.

BOURGUIGNON, L.Y.; RAMEZ, M.; GILAD, E.; SINGLETON, P.A.; MANMQ, CRUMRINE, D.A. Hyaluronan–CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126(6), p.1356–1365, 2006.

BOWESTRA, J.A. The lipid organisation in the skin barrier. **Acta Dermology and Venereology**, Supp 208, p.23-30, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004.

BROWN, M.B.; JONES, S.A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v.19: p.308–318, 2005.

BRUINS, M. E.; THEWESSEN, A. J.; JANSSEN, H.; BOOM, R. M. Enzyme inactivation due to maillard reaaions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: influence of enzyme immobilisation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21(1-2): p.31-34, 2003.

BRUYERE, O.; REGINSTER, J.Y. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. **Drugs Aging**, v.24, p.573-580, 2007.

CAPOMACCHIA, A.C.; GARNER, S.T. Glucosamine and glucosamine/anti-inflammatory mutual prodrugs, compositions, and methods, **US Patent** application 8.361.990 B2., 2013.

CARLOTTI, M.E.; GALLARATE, M.; SAPINO, S.; UGAZIO, E. W/O/W Multiple Emulsions for Dermatological and Cosmetic Use, Obtained with Ethylene Oxide Free Emulsifiers. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.26(2), p.183-192, 2005.

CHEN, A. L. Transdermal chondroitin and glucosamine delivery system and method of use. **United states patent application publication**. Pub. No.: US 2005/0232980 A1, Oct. 20, 2005.

CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems**. Second Edition. Revised and Expanded. Ed. Dekker, p.302-310, 1992.

CIFTER, U.; TÜRKYILMAZ, A.; AKALIN, M. N. P.; ZENGINER, M. S.; ÖNER, L. Topical pharmaceutical gel compositions of flurbiprofen, glucosamine and chondroitin. **European patent specification**, EP 2 460 514 B1, 2013.

COLE, M.L.; WHATELEY, T.L. Preparation of Stable Multiple W/O/W Emulsions

Using Pluronic (Polaxamer): Poly(acrylic Acid) Complexes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.175 (2): p.281-288, 1995.

COLE, M.L.; WHATELEY, T.L. Release rate profiles of theophylline and insulin from stable multiple w/o/w emulsions. **Journal of Controlled Release**, v.49: p.51–58, 1997.

COUTO, A.; FERNANDES, R.; CORDEIRO, M.N.S.; REIS, S.S.; RIBEIRO, R.T.; PESSOA, A.M. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v.177: p.74–83, 2014.

COUTO, M.I.P.B. Avaliação estrutural e reológica de emulsões preparadas com óleo de *Dipterix alata* Vog. (Baru), estabilizadas com goma arábica e quitosana. **Dissertação para obtenção do título de mestre** em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Goiás, 2014.

CUZZI-MAYA, T.; PIÑEIRO-MACEIRA, J. **Dermopatologia: Bases para Diagnóstico Morfológico**. Editora Roca. São Paulo, p.6-11, 2001.

DAL´BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e Ginkgo biloba. 176f. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DAMIEN, F.; BONCHEVA, M. The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin In Vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130: p.611–614, 2010.

DARLENSKI, R.; SASSNING, S.; TSANKOV, N.; FLUHR, J.W. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, p.295–303, 2009.

DAVIDSON, G. Glucosamine and Chondroitin sulfate. **Compendium, North Carolina Stat University**, p.454-458, 2000.

DEAL, C. L.; MOSKOWITZ, R.W. Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis - The Role of Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and Collagen Hydrolysate. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.25 (2), p.379-395, 1999.

DEY, S.; ROTHE, H.; PAGE, L. ROBERT, O.C.; FARAHMAND, S.; TONER, F.; MARSH, R.; WEHMEYER, K.; ZHOU, S. An in vitro Skin Penetration Model for Compromised Skin: Estimating Penetration of Polyethylene Glycol [ 14 C]-PEG-7 Phosphate. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.28, p.12–21, 2014.

DOSTROVSKY, N.R.; TOWHEED, T.E.; HUDSON, R.W.; ANASTASSIADES, T.P. The effect of glucosamine on glucose metabolism in humans: a systematic review of the literature. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.19 (4), p.375–380, 2011.

ECHARD, B., TALPUR, N., FUNK, K., BAGCHI, D. & PREUSS, H. Effects of oral glucosamine and chondroitin sulfate alone and in combination on the metabolism of SHR and SD rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.225, p. 85-91, 2001.

EL-SAHARTY, Y. S.; BARY, A.A. High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. **Analytica Chimica Acta**, v.462: p.125–131, 2002.

ENGEL, R.H.; RIGGI, S.J.; FAHRENBACH, M.J. Insulin-intestinal absorption as water-in-oil-in-water emulsions, **Nature**, v.219, p.856–857, 1968.

ERHAN, B.; GÜNDÜZ, B.; ÜSTÜNEL, S.H.; BARDAK, A.N.; SAVAŞ, F.; ISKA, G.; KARAKOYUN, Z. The Efficacy of Topical Glucosamine Sulfate-Chondroitin Sulfate in Knee Osteoarthritis Treated With Physical Therapy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v.58, p.194-198, 2012.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Dietary Supplement, Health and Education Act of 1994. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Supplement, Health and Education Act of 1994**, Dezembro 1995.

FENTON, J.I.; CHLEBEK-BROWN, K.A.; PETERS, T.L. Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture. **Osteoarthritis Cartilage**, v.8, p.258–265, 2000.

FERREIRA, A. O.F. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2ª ed., Pharmabooks, São Paulo, 2002

FLORENCE, A.T.; WHITEHILL, D. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.79 (1), p.243-256, 1981.

FLORENCE, A.T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. Review Article. **International Journal of Pharmaceutics**, v.11, p.277-308, 1982.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas**, v.30(3), p.263-271, 2009.

FRASCH, H.F.; BARBERO, A.M. Application of numerical methods for diffusion-based modeling of skin permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.208–220, 2013.

FRENKEL, M.; SHWARTZ, R.; GARTI, N. Multiple emulsions: I. Stability: Inversion, apparent and weighted HLB. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.94(1), p.174–178, 1983.

FRESNEL, M.; HERNANDEZ, M.; MADELEINE, M. **Manual de Cosmetologia**. 3ª Edição. Revinter. Rio de Janeiro, p.19-45, 1999.

GANONG, W. **The general & cellular basis of medical physiology**, In: "Review of medical physiology". BARNES, D.; RANSOM, J., eds, Appleton & Lange, p.1-45, 1999.

GARNER, S. T.; BRIDGETTE J. I.; ACHMED, H.; CAPOMACCHIA, A.C. Transdermal Permeability of N-Acetyl-D-Glucosamine. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.12, p.169–174, 2007.

GARNER, S. T. Pharmaceutical preformulation- osteoarthritis therapy via two drug delivery applications: the mutual prodrug and the transdermal delivery of a well-known nutraceutical, glucosamine. **Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of The University of Georgia**, ATHENS, GEORGIA 2005. Disponível em: [https://getd.libs.uga.edu/pdfs/garner\\_solomon\\_t\\_200505\\_phd.pdf](https://getd.libs.uga.edu/pdfs/garner_solomon_t_200505_phd.pdf). Acessado em Junho 2014.

GEIGER, S.; TOKGOZ, S.; FRUCTUS, A.; JAGER-LEZER, N.; SEILLER, M.; LACOMBE, C.; GROSSIORD, J. L. Kinetics of swelling-breakdown of W/O/W multiple emulsion: possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. **Journal of Controlled Release**, v.52, p.99-107, 1998.

GHOSH, P. Surface Tension - NPTEL - Chemical Engineering - **Interfacial Engineering, Module**, v.2, p.3-5, 2014.

GOUZE, J.N.; BIANCHI, A.; BECUWE, P.; DAUCA, M.; NETTER, P.; MAGDALOU, J.; TERLAIN B.; BORDJI, K. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level and by inhibiting the NF-B pathway. **Federation of European Biochemical Societies**, v.510, p. 166–170, 2002.

GREEN, B.A.; EDISON, B.L.; WILDNAUER, R.H.; HWU, R.H. Derivatives of Sugar Compounds Provide Anti-Aging Effects. **American Academy of Dermatology Poster Exhibit**, Washington, DC, 2004.

GREEN, B.A.; WILDNAUER, R.H.; BRENDA, L.; EDISON, B.A. Topical n-acetyl glucosamine provides fast acne-reducing benefits and mildness demonstrating its potential utility in enhancing conventional rx or otc acne treatments. Poster exhibit at the 65th **Annual American Academy of Dermatology Meeting**; Washington, DC; February p. 2-6, 2007.

GRIBBON, P.; HENG, B.C.; HARDINGHAM, T.E. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. **Biochemical Journal**, v.350, p.329–335, 2000.

HAAKE, A.; HOLBROOK, K. The structure and development of skin, In: "**Dermatology in general medicine**", FREEDBERG, I.; EISEN, A.; WOLFF, K.; AUSTEN, K.; GOLDSMITH, L.; KATZ, S.; FITZPATRICK, T. Eds., McGraw-Hill, p.70-114, 1999.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, v.17, p.6–15, 2004.

HATHCOCK, J. N.; SHAO, A. Risk assessment for glucosamine and chondroitin sulfate. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, p.78–83, 2007.

HAUSELMANN, H. J. “Nutripharmaceuticals for Osteoarthritis”. **Best Practice and Research**, v.5(4), p. 598-607, 2001.

HERBERT, W.J. Multiple emulsions, a new form of mineral adjuvant, **Lancet**, v.11 – 771, 1965.

HERNÁNDEZ-MARÍN, N.Y.; LOBATO-CALLEROS, C.; VERNON-CARTER, E.J. Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. **Journal of Food Engineering**, v.119, p.181–187, 2013.

HUDSON, D.L.; SLEEMAN, J.; WATT, F.M. CD44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. **Journal of Cell Science**, v.108, p.1959-1970, 1995.

IMOKAWA, G.; MISHIMA, Y. Analysis of tyrosinases as asparagin-linked oligosaccharides by conavalin A lectin chromatography: appearance of new segment of tyrosinases in melanoma cells following interrupted melanogenesis induced by glycosylation inhibitors. **Journal of Investigative Dermatology**, v.85, p.165-168, 1985.

ISHAQ, S. Hyaluronic acid and chondroitin sulfate based hydrolyzed collagen type ii and method of making same. **United States Patent**. Patent No.: US 8,563,045 B2, Oct. 22, 2013.

ISRAEL, B.; SOLOMON, T; GARNER, M. T.; ELDER, D.; ABNEY, T.; AZADI, P.; BEACH, J. W.; PRICE, J. C.; AHMED, H.; CAPOMACCHIA, A.C. Transdermal permeation of novel n-acetyl-glucosamine/ NSAIDs mutual prodrugs. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.17(1), p.48–54, 2012.

JACOBS, E. Topically applied glucosamine sulfate and all its related, Precursor, and derivative compounds significantly increases the skin's natural production of hyaluronic acid for the rejuvenation of healthier younger-looking skin; while Phosphatidylcholine is required to replace its deficiency caused by topical dimethylaminoethanol (DMAE). **United States Patent Application Publication**. Pub. No.: US 2007/0092469 A1, Apr. 26, 2007.

JAGER- LEZER, N.; TERRISSE, I.; BRUNEAU, F.; TOKGOZ, S.; FERREIRA, L.; CLAUSSE, D.; SEILLER, M.; GROSSIORD, J. L. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of hydrosoluble molecule entrapped in a A/O/A multiple emulsion. **Journal of Controlled Release**, v. 45, p.1-13, 1997.

JANG-HEE, O.; KIM, Y. K.; YONG JUNG, J.; JEONG-EUN, S.; KIM, K.H.; CHO, K. H.; EUN, H. C.; CHUNG, J. H. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. **Journal of Dermatological Science**, v.62, p.192–201, 2011.

JEANLOZ, R.W.; FORCHIELLI, E. Studies on Hyaluronic acid and related substances: II. Periodate oxidation of Glucosamine and Derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v.188, p.361-369, 1951.

JIGAR, V.; ADARSH, S.; DHAVAL, R.; VIJAY, P. Development of stable multiple emulsion of atorvastatin. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2(2), p. 419 – 428, 2011.

JUHLIN, L. Hyaluronan in skin. **Journal of Internal Medicine**, v.242, p.61–66, 1997.

JUNGMAN, E.; LAUGEL, C.; KASSELOURI, A.; BAILLET-GUFFROY, A. Study Of The Potential Of Stratum Corneum Lipids And Exogenous Molecules Interaction By Fluorescence Spectroscopy For The Estimation Of Percutaneous Penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.434, p.183–190, 2012.

KANETO, H., XU, G., SONG, K.H., SUZUMA, K., BONNER-WEIR, S., SHARMA, A., WEIR, G.C. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p. 31099–31104, 2001.

KANWISCHER, M.; SEOK-YONG, K.; SUN KIM, J.; BIAN, S.; KWON, K.A.; DAE-DUK, K. Evaluation of the physicochemical stability and skin permeation of glucosamine sulfate. **Drug development and industrial pharmacy**, v.1, p.91-97, 2005.

KEDE, M.P.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. Editora Atheneu. São Paulo, p.3-8, 2004.

KHAN A.; TALEGAONKAR, S.; IQBAL, Z.; AHMED, F.J.; KHAR, R.K. Multiple emulsions: an overview. **Current drug delivery**, v.3(4), p.429-43, 2006.

KIMBALL, A.B.; KACZVINSKY, J.R.; LI, J.; ROBINSON, L.R.; MATTS, P.J.; BERGE, C.A.; MIYAMOTO, K.; BISSETT, D.L. Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation after use of moisturizers with a combination of topical niacinamide and N-acetyl glucosamine: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled trial. **British Journal of Dermatology**, v.162, p.435–441, 2010.

KING, L.S.; KOZONO, D.; AGRE, P. From structure to disease: The evolving tale of Aquaporin biology. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, v.5: p. 687-698, 2004.

KUBO, A. Structural and Immunological Barriers of the skin as potential therapeutic targets. **Yakugaku Zasshi**, v. 134(5), p. 623, 2014.

KUMAR, R.; KUMAR, M.S.; MAHADEVAN, N. Multiple Emulsions: A Review. **International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research**, v.2(1), p.9-19, 2012.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3<sup>a</sup> Edition, Chapter: Basic Chemical Principles Related to Emulsion and Suspension Dosage Forms, p.100-122 e 514-517, 1986.

LAM, R.S.H.; NICKERSON, M.T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. **Foods Chemistry**, v.141(2), p.975-984, 2013.

LAMARI, F.N.; KARAMANOS, N.K. Structure of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology**, Patras, v.53, 2006.

LEE, M. C. Cream composition enhancing skin absorption of glucosamine. **United States Patent application publication**. Pub. NO.: US 2013/0330373 A1, Dec. 12, 2013.

LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M. Dermofarmácia: **Bases Dermocosméticas, Microemulsões e Lipossomas**. Editora Rx. São Paulo, p. 13-26, 2008.

LÉVÊQUE, J.; ELSNER, P.; BERARDESCA, E.; MAIBACH, H.; Water-keratin Interactions, In: **"Bioengineering of the skin: Water and Stratum corneum"**, eds, CRC Press, p.13-22, 1994.

LEWIS, C. "Arthritis: Timely Treatments for an Ageless Disease". **U.S. Food and Drug Administration Consumer Magazine**, v.34(3), p.27-33, 2000.

LI, J.; TANG, H.; HU, X.; CHEN, X.; XIE, H. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. **Australasian Journal of Dermatology**, v.51, p.106–112, 2010.

LIANG, Z.; LESLIE, J. ADEBOWALE, A.; ASHRAF, M. EDDINGTON, N. D. Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.20, p.807–814, 1999.

LIPPIELLO, L., WOODWARD, J., KARPMAN, R. & HAMMAD, A. In vivo chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and chondroitin sulfate. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 381, p. 229–240, 2000.

LOBATO-CALLEROS, C.; SOSA-PEREZ, A.; RODRIGUEZ-TAFOYA, J.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; PEREZ-ALONSO, C.; VERNON-CARTER, E.J. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1847-1856, 2008.

LOPES JUNIOR, O. V.; INACIO, A.M. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 48(4), p.300-306, 2013.

LOZADA, C. J. Glucosamine in osteoarthritis: questions remain. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.74, p. 65-71, 2007.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B.A.; RASUL, A.; KHAN, H.M. Fabrication, physicochemical characterization and preliminary efficacy evaluation of a W/O/W

multiple emulsion loaded with 5% green tea extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49(2), p.341-349, 2013.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; MANICKAM, S. Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stability. **Journal of Nanobiotechnology**, v.12:20, p.1-8, 2014.

MALAEKEH-NIKOUEI, B.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; SALMANI-CHAMANABAD, S.; MOSALLAEI, N.; JAMIALAHMADI, K. Preparation, characterization, and moisturizing effect of liposomes containing glucosamine and N-acetyl glucosamine. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.12(2), p.96-102, 2013.

MALLU, U.R.; REDDY, K.H.; BOBBARALA, V.; PENUMAJJJI, S. HPLC Method Development for Glucosamine Sulphate and Diacerein Formulation. **Journal of Pharmacy Research**, v.3(2), p.361-363, 2010.

MAMMONE, T.; GAN, D.; FTHENAKIS, C.; MARENUS, K. The effect of N-acetyl-glucosamine on stratum corneum desquamation and water content in human skin. **Journal of Cosmetic Science**, v.60(4), p.423-428, 2009.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

MATSUMOTO, S.; KITA, Y.; YONEZAWA, D. An attempt at preparing water-in-oil-in-water multiple-phase emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 57, 353 – 361, 1976.

McALINDON, T.E.; LA VALLEY, M.P.; GULIN, J.P.; FELSON, D.T. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. **Journal of American Medical Association**, v.283, p.1469-1475, 2000.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, v.7, p.2297-2316, 2011.

MILEWSKI, S. Glucosamine-6-phosphate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1597, p. 173–192, 2002.

MIWA, I.; MITA, Y.; MURATA, T.; OKUDA, J.; SUGIURA, M.; HAMADA, Y.; CHIBA, T. Utility of 3-O-methyl-N-acetyl-D-glucosamine, an N-acetylglucosamine kinase inhibitor, for accurate assay of glucokinase in pancreatic islets and liver. **Enzyme Protein**, v.48, p. 135–142, 1994.

MIZUMOTO, S.; MURAKOSHI, S.; KALAYANAMITRA, K.; DEEPA, S.S.; FUKUI, S.; KONGTAWELERT, P.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K. Highly sulfated hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage: Insights into the sugar sequences with bioactivities. **Glycobiology** vol. 23 n<sup>o</sup>.2.; p.155–168, 2013.

MONAUNI, T.; ZENTI, M.G.; CRETTI, A.; DANIELS, M.C.; TARGHER, G.; CARUSO, B.; CAPUTO, M.; MCCLAIN, D.; DEL PRATO, S.; GIACCARI, A.; MUGGEO, M.; BONORA, E.; BONADONNA, R.C. Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans. **Diabetes**, v.49, p. 926–935, 2000.

MORAIS, G.G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). 181 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2006.

MORAIS, J.M. Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/O em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino. **Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas** pela USP, Ribeirão Preto, 231 p., 2008.

MORRISON, I.D.; ROSS, S. **Emulsions. Colloidal dispersions – Suspensions, Emulsions and Foams**. New York: John Wiley & Sons Ltd. (Ed.), p.420-455, 2002.

MURILLO-MARTÍNEZ, M.M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTER, E.J. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v.25: p.577-585, 2011.

NAGARAJAN, P.; DINAKARAN, S. K.; GHOSH, S.; AVASARALA, H.; NALLAYYA. M.; BANJI, D. Method Development and Validation for Glucosamine and Chondroitin Sulphate in Softlet Form by RP-HPLC. Research and Reviews: **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2(3): p.6-10, 2013.

NETO, S.C. **Usos e Aplicações do Óleo de Mamona**. Instituto de Química – USP – São Carlos. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/palestras/Salvador%20Claro%20Neto.PDF> Acessado em Janeiro, 2016.

OBAGI, Z.E. **Restauração e Rejuvenescimento da Pele** – Incluindo Classificação Básica dos Tipos de Pele. Livraria e Editora Revinter Ltda., ISBN.: 85-7309-735-3, Cap. 1: p. 8-13, Rio de Janeiro, 2004.

OCHALEK, M.; PODHAISKY, H.; RUETTINGER, H.H.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation – Part II: Diffusion and permeation of model drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p.360–366, 2012.

OMOTOSHO, J. A.; LAW, T. K.; WHATELY, T. L.; FLORENCE, A. T. The stabilization of w/o/w emulsions by interfacial interaction between albumin and non ionic surfactants. **Colloids and Surfaces**, v.20, p.133-144, 1986.

OMOTOSHO, J. A. The effect of acacia, gelatin and polyvinylpyrrolidone on chloroquine transport from multiple W/O/W emulsions. **International Journal of**

**Pharmaceutics**, v.62, p. 81-84. 1990.

OPAWALE, F.O.; BURGESS, D.J. Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. **Journal of Colloid Interface Science**, v.197(1), p.142-150, 1998.

OSBORNE, R.; MULLINS, L.; ROBINSON, L. Topical N-acetylglucosamine and niacinamide increase hyaluronan in vitro. **Jornal American Academy Dermatology**, **54**: AB106, 2006.

PAIVA, K.V. Desenvolvimento de novas tecnologias para minitubos de calor: análise teórica e experimental. **Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica** pela Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

PAULA, D.A. Emulsões a/o/a contendo cloreto de sódio: correlações entre características físicas e intensidade da percepção do gosto salgado. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2015.

PAVÃO, M.S.G.; VILELA-SILVA, A.C.; MOURÃO, P.A.S. Biosynthesis of chondroitin sulfate: from the early precursor discoveries to nowadays, genetics approaches. **Advances in Pharmacology**, Rio de Janeiro, v.53, p.117-140, 2006.

PAVELKÁ, K.; GATTEROVÁ, J.; OLEJAROVÁ, M.; MACHACEK, S.; GIACOVELLI, G.; ROVATI, R.C. Glucosamine Sulfate Use and Delay of Progression of Knee Osteoarthritis A 3-Year, Randomized, Placebo-Controlled, Double-blind Study. **American Medical Association**, v.162, p.2113-2123, 2002.

PEREIRA, L.J.B.; GARCIA-ROJAS, E.E. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.45(1), p.155-162, 2015.

PERSSONELLE, J.G. **Cosmiatria: A Ciência da Beleza**. Cap. 1, p.3-25. Editora Revinter, 2004.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.L.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; DE MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 44(2), 2008.

PICHOT, R. Stability and Characterisation of Emulsions in the presence of Colloidal Particles and Surfactants. **Thesis submitted to the University of Birmingham for the degree of Doctor of Philosophy**, p.55-59, 2010.

PINTO, P.C. Mathematical modelling of epidermal barrier function. **Tese (Mestrado)**. **Universidade de Lisboa**, Lisboa- Portugal, 2003.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 4 ed. v. 1. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**. p. 169-170 e 972-

983, 1992.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 4.ed. Lisboa, Calouste Gulbenkian, v.I, 1996.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.; JENSEN, J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1063–1072, 2008.

RELE, A.S.; MOHILE, R.B. Effect of mineral oil, sunflower oil, and coconut oil on prevention of hair damage. **Journal of Cosmetics Science**, v.54, p.175-192, 2003.

RICHY, F.; BRUYERE, O.; ETHGEN, O.; CUCHERAT, M.; HENROTIN, Y.; REGINSTER, J.Y. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. **American Medical Association**, v.163(13), p.1514-1522, 2003.

RISSI, N.C. Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos. **Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP, 2013.

RITCHER, T.; PEUCKERT, C.; SATTLER, M.; KOENIG, K.; RIEMANN, I.; HINTZE, U.; WITTERN, K.P.; WIESENDANGER, R.; WEPF, R. Dead but highly dynamic - the Stratum corneum is divided into three hydration zones. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.17, p.246-257. 2004.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; FETT, R. Fatty acid composition of grape (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) seed oil. **Brazilian Journal of Food Technology**, III SSA, novembro 2010.

RONDLE, C. J. M.; MORGAN, W. T. J. The Determination of Glucosamine and Galactosamine. **The Lister Institute of Preventive Medicine**, v.61, p.586-589, 1955.

ROSSIGNOLI, P.; PONTAROLO, R.; CORRER, C.J. Determinação Espectroscópica multivariada de Glucosamina e Condroitina em Formulações Farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31(6), p.1285-1289, 2008.

ROUGHLEY, P. J. The structure and function of cartilage proteoglycans. **European Cells and Materials**, v.12, p. 92-101, 2006.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Sixth edition, p. 917, 2009.

SANTOS, C.V. Sulfato de Condroitina: da matéria-prima à terapêutica. **Monografia Graduação Medicina Veterinária**. UFRGS, 2009. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/22911>. Acessado em: Abril 2014.

SAYO, T.; SAKAI, S.; INOUE, S. Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. **Skin Pharmacology and**

**Physiology**, v.17, p.77–83, 2004.

SCARIOTTO, M.C. Estudo da utilização da goma xantana como auxiliar no processo de floculação em tratamento de água para abastecimento. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, do Curso Superior de Engenharia Ambiental da Coordenação de Engenharia Ambiental – COEAM - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR**, 2013.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; NISSING, C.; RUNKEL, F. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.338, p.184–192, 2009.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; GULDAN, A.-C.; PAULUS, N.; RUNKEL, F. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng. Aspects**, v.372, p.48–54, 2010.

SCHMIDT, U.S.; BERNEWITZ, R.; GUTHAUSEN, G.; SCHUCHMANN, H.P. Investigation and application of measurement techniques for the determination of the encapsulation efficiency of O/W/O multiple emulsions stabilized by hydrocolloid gelation. **Colloids Surf. A: Physicochemical Eng. Aspects**, v.475, p.55-61, 2015.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; SCHLUPP, P.; NISSING, H.; GARN, H.; RUNKEL, F. Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.398, p.107-113. 2010.

SCROGGIE, D.A., ALBRIGHT, A., HARRIS, M.D. The effect of glucosamine-chondroitin supplementation on glycosylated hemoglobin levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. **American Medical Association**, v.163, p.1587–1590, 2003.

SHAO, Y.; ALLURI, R.; MUMMERT, M.; KOETTER, U.; LECH, S. A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.35, p.625–631, 2004.

SHAO, H.-J.; LEE, Y.-T.; CHEN, C.-S.; WANG, J.-H.; YOUNG, T.-H. Modulation of gene expression and collagen production of anterior cruciate ligament cells through cell shape changes on polycaprolactone/chitosan blends. **Biomaterials**, v.31, p.4695-4705, 2010.

SHATALEBI, M. A.; MOSTAFAVI, S.A.; MOGHADDAS, A. Niosome as a drug carrier for topical delivery of N-acetyl glucosamine. **Research in Pharmaceutical Science**, v.5(2), p.107–117, 2010.

SHIKHMAN, A.R.; KUHN, K.; ALAAEDDINE, N.; LOTZ, M. N-Acetylglucosamine prevents IL-1-mediated activation of human chondrocytes. **Journal of Immunology**, v.166, p. 5155–5160, 2001.

SIGWARD, E.; MIGNET, N.; RAT, P.; DUTOT, M.; MUHAMED, S.; GUIGNER, J.-M.;

SCHERMAN, D.; CRAUSTE-MANCIET, S. Formulation and cytotoxicity evaluation of new self-emulsifying multiple W/O/W nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.611–625, 2013.

SIQUEIRA, N.M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SMEDEN, J.V.; JANSSENS, M.; GOORIS, G.S.; BOUWSTRA, J.A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1841, p.295–313, 2014.

SOO-YOUL, K.; CHANG-HOON, L.; AI-YOUNG, L. Composition for treatment of atopic dermatitis comprising glucosamine and derivatives thereof and a method for treatment of atopic dermatitis using them. **United States Patent Application publication**. US 2012/0156137 A1. Jun. 21, 2012.

SOUSA, A. S. Cromatografia de permeação em gel em escala Semi-preparativa aplicada à caracterização, Purificação e fracionamento do ácido Hialurônico produzido por cultivo de Microorganismos. **Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química**, da Universidade Federal do Ceará, CRB-3/572, S696c, 2007.

SOUZA, R.S.; PINHAL, M.A.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36(1), p.48-54, 2011.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Skin and Breast**, In: “Histology”, Gower Medical Publishing, London, p.348-363, 1992.

TADROS, T.F. Emulsion Science and Technology: A General Introduction. **Emulsion Science and Technology**, p.1-4, 2009.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **FASEB J**, v.20(1), p.9–22, 2006.

TEIXEIRA, G.L. Estudo da estabilidade e comportamento reológico de emulsões de gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) com diferentes tensoativos. **Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos**, Universidade Federal do Paraná, 2014.

THEODASAKIS, J.; FOX, B.; ADDERLY, B. **The Arthritis Cure**. 1st Edition. St. Martin's Press. New York, NY, 1997.

TOFFOLETTO, O.; TAVARES, A.; CASARINI, D.E.; REDUBLO, B.M.; RIBEIRO, A. B. Farmacocinética da associação de glucosamina e sulfato de condroitina em humanos sadios do sexo masculino. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.13, p.235-237, 2005.

TONELI, J.T.C.L.; MURR, F.E.X.; PARK, K.J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, v.7, n.2, p.181-204, 2005.

TROMMER, H.; WARTEWIG, S.; BOTTCHEER, R. The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.254: p.223–234, 2003.

TYLER, T.; KHANDELWAL, B.; NORDEN, D.; ROLLE, R. Determination of Chondroitin Sulfate in Raw Materials by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v.85(3), p.567-571, 2002.

VÁCLAVÍKOVÁ E.; KVASNIČKA F. Isotachophoretic determination of glucosamine and chondroitin sulphate in dietary supplements. **Czech Journal of Food Science**, v.31, p.55–65, 2013.

VAZQUEZ, L.C.M.; MORENO, B.N.; SANCHEZ, C.M. The stratum corneum epidermis: much more than an inert barrier: implications in cosmetic treatments. **PIEL**, v. 26(8), p.412–419, 2011.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. Cosmetria II – Ciencia que comprende la atención cosmética de la piel sana o enferma. **Americana de Publicaciones SA. Buenos Aires**. Argentina, p.22-30, 1991.

WARNER, R.; LILLY, N. Correlation of water content with ultrastructure in the stratum corneum, In: **“Bioengineering of the skin: Water and Stratum corneum”** ELSNER, P.; BERARDESCA, E.; MAIBACH, H., eds, CRC Press, p.3-12, 1994.

WEINDL, G.; SCHALLER, M.; SCHAFFER-KORTING, M.; KORTING, H.C. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular, biological, pharmaceutical and clinical aspects. **Skin Pharmacological and Physiology**, v.17, p.207–213, 2004.

WIESCHER, J.W. Skin Barrier: Chemistry of skin Delivery Systems. **Carol Stream; Allured Publishing Corp**, p.657, 2008.

WOOLERY-LLOYD, H.; KAMMER, J.M. Treatment of Hyperpigmentation. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.30, p.171-175, 2011.

WU, Y.; HUSSAIN, M.; FASSIHI, R. Development of a simple analytical methodology for determination of glucosamine release from modified release matrix tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.263–269, 2005.

YARRANTON, H.W.; SZTUKOWSKI, D.M.; URRUTIA, P. Effect of interfacial rheology on model emulsion coalescence. I. Interfacial rheology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.310, p.246-252, 2007.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de Óleos de Origem Vegetal. Curitiba: Editora

da UFPR. **Visão Acadêmica** v.3(1), p.13-18, 2002.

ZATTA, K. C. Desenvolvimento e caracterização de formulações semissólidas contendo palmitato de ascorbila associado à nanocarreadores, Centro Universitário Franciscano, 2011.119 f.: il. **Dissertação (Mestrado em Nanociências)**, 2011.

ZHOU, N.; ZAN, X.; WANG, W.; WU, H.; YIN, D.; LIAO, C.; WAN, Y. Galactosylated chitosan–polycaprolactone nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p.420–429, 2013.