

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBÉLI MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  PARA O  
CARREAMENTO DE ÁCIDO GÁLICO PARA FINS FARMACÊUTICOS E  
ALIMENTARES**

CURITIBA

2017

CIBÉLI MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> PARA O  
CARREAMENTO DE ÁCIDO GÁLICO PARA FINS FARMACÊUTICOS E  
ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Josiane de Fátima Gaspari Dias  
Coorientadoras: Prof.<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra Maria Warumby Zanin  
Prof.<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2017

Martins, Cibéli

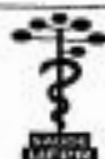
Desenvolvimento de uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  para o carreamento de ácido gálico para fins farmacêuticos e alimentares / Cibéli Martins – Curitiba, 2017.  
90 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias  
Coorientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumby Zanin  
Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Ácido gálico. 2. Polifenol. 3. Antioxidante. 4. Hidroxiácidos. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. II. Zanin, Sandra Maria Warumby. III. Montrucchio, Deise Prehs. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título

CDD 615.19




## TERMO DE APROVAÇÃO


**CIBÉLI MARTINS**

**Título: "DESENVOLVIMENTO DE UMA EMULSÃO MÚLTIPLA (A1/O/A2) PARA O CARREAMENTO DE ÁCIDO GÁLICO PARA FINS FARMACÊUTICOS E ALIMENTARES"**

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>. Josiane de Fátima Gaspar Dias  
Orientadora

  
Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristiane da Silva-Paula de Oliveira  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de fevereiro de 2017.

Dedico essa dissertação aos meus pais e ao meu marido,  
por todo amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que colocou em meu caminho.

Aos meus pais, Lidia e Hernani, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação como pessoa e acadêmica, a eles devo tudo o que eu sou e tudo que alcancei.

Ao meu marido Tarcísio Luís, meu eterno namorado, que nos momentos mais difíceis não me deixou desistir e sempre me apoiou a continuar a estudar e perseverar na minha trajetória profissional.

A minha família, Érica, Héber, Hernani Jr. e Nataly por estarem sempre presentes, dispostos a me ajudar e compreenderem esse meu jeito de ser.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josiane de Fátima Gaspari Dias, por me acolher, dividir comigo seus conhecimentos e dar “aquela luz” quando a dúvida surgia. Sua paciência e competência profissional são exemplos a serem seguidos.

A minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Warumby Zanin, e ao seu esposo, Pedro Zanin, por toda a ajuda e ensinamentos para a realização desse trabalho.

Aos professores, Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel, Dr<sup>o</sup>. Obdulio Gomes Miguel e Dr<sup>a</sup>. Deise Prehs Montrucchio, por todos os conselhos pessoais e profissionais.

A Maria da Graça Teixeira de Toledo, técnica da Central Analítica da Universidade Federal do Paraná, por toda ajuda na utilização dos equipamentos e desenvolvimento do método por cromatografia líquida.

A doutoranda Mona Lisa Simionatto Gomes pela ajuda com as análises.

Aos colegas e amigos do laboratório, com os quais dividi experimentos, risadas, conhecimento e muito trabalho.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram, aqueles que fiz ao longo da vida e aos que conheci durante a pós-graduação, vocês foram responsáveis pelos momentos de descontração, pelos “cafés” e por serem aquela válvula de escape quando a mente estava cansada.

Aos professores, Dr<sup>o</sup>. Vitor Alberto Kerber e Dr<sup>a</sup>. Cristiane da Silva Paula, por aceitarem fazer parte da banca e contribuir para a melhoria desse trabalho.

A Universidade Federal do Paraná, a CAPES (Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior) e ao Programa Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e apoio para a obtenção do título de mestre.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

## RESUMO

O ácido gálico é um polifenol pertencente à classe dos hidroxiácidos que apresenta solubilidade em água de 18,90 g /100 mL a 25°C e alta capacidade antioxidante, atividade antitumoral, cardioprotetora, hepatoprotetora e antiofídica. Entretanto, apresenta sensibilidade a luz, ao calor e ao oxigênio, e possui baixa meia vida. As emulsões múltiplas permitem a proteção de compostos, a melhora do desempenho, a liberação controlada, e permitem a veiculação de princípios ativos em todas as fases, melhorando a solubilidade e evitando que esses sejam expostos aos fatores ambientais quando adicionados à fase interna. As emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) são sistemas que possuem uma fase aquosa dispersante que contém glóbulos de óleo com glóbulos de água dispersos no seu interior. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  com o ácido gálico presente na fase aquosa interna ( $A_1$ ). Inicialmente, foi desenvolvido e validado o método de quantificação por CLAE-UV do ácido gálico para a análise de possíveis incompatibilidades com os excipientes presentes na fase aquosa interna. As variáveis avaliadas foram escolha do tensoativo lipofílico, sistema tamponante, eletrólitos na fase aquosa interna, tensoativo hidrofílico, polissacarídeos na fase aquosa externa ( $A_2$ ), e a influência da temperatura e ordem de adição na segunda etapa de emulsificação. Após o desenvolvimento da emulsão múltipla foi analisada a viscosidade e a estabilidade por meio do índice de estabilidade, o pH, a concentração de ácido gálico e a atividade antioxidante pela técnica do complexo de fosfomolibdênio. O método de quantificação atendeu as especificações exigidas para a validação e os excipientes selecionados não demonstraram interferir na estabilidade do ácido gálico. Foi utilizado o processo de emulsificação em duas etapas, onde inicialmente foi preparada uma emulsão primária água-em-óleo ( $A_1/O$ ) que foi submetida a uma segunda etapa de emulsificação resultando na emulsão  $A_1/O/A_2$ . A emulsão primária  $A_1/O$  que apresentou melhor estabilidade foi composta por água destilada, poliglicerol polirricinoleato (PGPR), cloreto de sódio, ácido gálico e sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0. A segunda etapa consistiu na adição da emulsão primária sobre a fase aquosa externa ( $A_2$ ) composta de água destilada, polisorbato 80 e goma xantana. Ambas as etapas de emulsificação foram executadas a frio. A emulsão múltipla apresentou comportamento pseudoplástico e o EHL no qual houve maior estabilidade foi 8,769. Após 28 dias de análise, sem variação do pH, a emulsão desenvolvida apresentou um índice de estabilidade de 75%, 89,61% da concentração inicial de ácido gálico e 57,46% da atividade antioxidante inicial. Conclui-se, portanto, que a emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  desenvolvida manteve-se estável por 28 dias sendo capaz de carrear o ácido gálico para fins farmacêuticos e/ou alimentares.

Palavras-chave: Ácido gálico. Polifenol. Antioxidante. Hidroxiácidos.

## ABSTRACT

Gallic acid is a polyphenol that belongs to the hydroxyl acid class, and which has water solubility of 18.90 g / 100 mL at 25°C. It also presents high antioxidant capacity, antitumor, cardioprotective, hepatoprotective and anti-phidemic activity. However, it is sensitive to light, heat and oxygen, and it has a low half-life. Multiple emulsions allow the protection of compounds, as well as improvement of performance, controlled release, and delivery of active principles at all stages, increasing solubility and preventing them from being exposed to environmental factors when added to the internal phase. Water-in-oil-in-water (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) multiple emulsions are systems which have an aqueous dispersant phase containing oil globules with water droplets dispersed inside it. Therefore, the present work had aimed the development of an A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> multiple emulsion with the gallic acid present in the internal aqueous phase (A<sub>1</sub>). Initially, a method for quantifying gallic acid by CLAE-UV was developed and validated for the analysis of possible incompatibility with the excipients present in the internal aqueous phase. The variables evaluated were lipophilic surfactant choice, buffering system, electrolytes in the internal aqueous phase, hydrophilic surfactant, polysaccharides in the external aqueous phase (A<sub>2</sub>), and the influence of temperature and addition order on the second emulsification stage. After the development of the multiple emulsion, the viscosity and stability were analyzed by means of the stability index, pH, gallic acid concentration and antioxidant activity by the phosphomolybdenum complex technique. The quantification method met the specifications required for validation and the selected excipients were not shown to interfere with the stability of gallic acid. It was used a two-stage emulsification process, where initially a primary water-in-oil (A<sub>1</sub>/O) emulsion was prepared, which was subjected to a second emulsification step resulting in the A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> emulsion. The primary emulsion A<sub>1</sub>/O which presented better stability was composed of distilled water, polyglycerol polyricinoleate (PGPR), sodium chloride, gallic acid and sodium acetate buffer system pH 5.0. The second step consisted in adding the primary emulsion to the external aqueous phase (A<sub>2</sub>) composed of distilled water, polysorbate 80 and xanthan gum. Both emulsification steps were performed at low temperatures. The multiple emulsion presented pseudoplastic behavior and the HBL in which there was greater stability was 8,769. After 28 days of analysis, with no pH variation, the emulsion developed had a stability index of 75%, 89.61% of the initial concentration of gallic acid and 57.46% of the initial antioxidant activity. It is concluded, therefore, that the developed A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> multiple emulsion remained stable for 28 days, and it was able to carry gallic acid for pharmaceutical and/or food purposes.

Key-words: Gallic acid. Polyphenol. Antioxidant. Hydroxy acids

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS .....	19
FIGURA 2 - FORMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO GÁLICO (ÁCIDO 3,4,5-TRIHIDROXIBENZÓICO).....	23
FIGURA 3 - POSSÍVEIS ROTAS PARA A BIOSÍNTESE DO ÁCIDO GÁLICO..	24
FIGURA 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS DIFERENTES TIPOS DE CRISTAIS.....	27
FIGURA 5 - FORMULA ESTRUTURAL DO POLIGLICEROL POLIRRICINOLEATO .....	29
FIGURA 6 - FORMULA ESTRUTURAL DO MONOOLEATO DE SORBITANO...	30
FIGURA 7 - FENÔMENOS DE INSTABILIDADE EM EMULSÕES.....	30
FIGURA 8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE EMULSÕES SIMPLES E MÚLTIPLAS .....	32
FIGURA 9 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO TENSOATIVO POLISORBATO 80..	35
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS ( $\lambda=215$ NM) OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV.....	53
FIGURA 11 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO PRIMÁRIA A <sub>1</sub> /O PARA A SELEÇÃO DO TENSOATIVO PRIMÁRIO .....	58
FIGURA 12 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO MÚLTIPLA A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> PARA A SELEÇÃO DAS PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA EXTERNA E EMULSÃO PRIMÁRIA COM O TENSOATIVO SECUNDÁRIO POLISORBATO 80.....	63
FIGURA 13 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO MÚLTIPLA PARA A SELEÇÃO DO POLISSACARÍDEO NA FASE AQUOSA EXTERNA (A <sub>2</sub> ) APÓS O PREPARO DA AMOSTRA .....	65
FIGURA 14 - MICROSCOPIA ÓTICA (100X) DA EMULSÃO MÚLTIPLA A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> PARA ANÁLISE DA ESTABILIDADE, APÓS 14 DIAS DE PREPARO.....	70

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	RELAÇÃO CLASSE E ESTRUTURA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	18
QUADRO 2 -	SOLUBILIDADE DO ÁCIDO GÁLICO EM METANOL, ETANOL, ÁGUA E ACETATO DE ETILA DE 293,2 – 333,2 K .....	25
QUADRO 3 -	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	40

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO ÁCIDO GÁLICO EM ÁGUA, NA FAIXA DE 200 NM A 350 NM .....	50
GRÁFICO 2 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL ANIDRO, NA FAIXA DE 200 NM A 350 NM .....	50
GRÁFICO 3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM ÁGUA NO $\lambda=264$ nm.....	51
GRÁFICO 4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL NO $\lambda = 273$ nm. ....	52
GRÁFICO 5 - CURVA ANALITICA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO OBTIDA POR CLAE-UV ( $\lambda=215$ nm) NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 48 A 72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	54
GRÁFICO 6 - VISCOSIDADE DA EMULSÃO MÚLTIPLA $A_1/O/A_2$ CONTENDO ÁCIDO GÁLICO (MPAS) <i>VERSUS</i> VELOCIDADE (RPM).....	67
GRÁFICO 7 - ÍNDICE DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO (IEE%) DURANTE 28 DIAS DE ARMAZENAMENTO .....	70
GRÁFICO 8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS $\lambda = 760$ NM.....	72
GRÁFICO 9 - ESTABILIDADE DO ÁCIDO GÁLICO NA EMULSÃO $A_1/O/A_2$ DURANTE 28 DIAS .....	72
GRÁFICO 10 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DA EMULSÃO MÚLTIPLA $A_1/O/A_2$ DURANTE 28 DIAS .....	74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	VARIAÇÃO DA FASE MÓVEL NO DECORRER DA ELUIÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV .....	42
TABELA 2	-	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO TENSOATIVO LIPOFÍLICO PARA A EMULSÃO MÚLTIPLA .....	44
TABELA 3	-	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO SISTEMA TAMPONANTE PARA A FASE AQUOSA INTERNA DA EMULSÃO MÚLTIPLA.....	45
TABELA 4	-	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO ELETRÓLITO PARA A FASE AQUOSA INTERNA DA EMULSÃO MÚLTIPLA .....	46
TABELA 5	-	VALORES DE SOLUBILIDADE PARA O ÁCIDO GÁLICO EM ÁGUA.....	51
TABELA 6	-	VALORES DE SOLUBILIDADE PARA O ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL.....	52
TABELA 7	-	RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS PARA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV .....	55
TABELA 8	-	PORCENTAGEM DE ÁCIDO GÁLICO REMANESCENTE NO TESTE COM OS EXCIPIENTES APÓS O ARMAZENAMENTO PELO PERÍODO DE 7 E 14 DIAS A TEMPERATURA AMBIENTE (20± 5°C; pH 6,8) .....	56
TABELA 9	-	CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO E VALOR CALCULADO DE EHL NAS FORMULAÇÕES DA EMULSÃO MÚLTIPLA EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA INTERNA E EMULSÃO PRIMÁRIA.....	62
TABELA 10	-	COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE EMULSÃO MÚLTIPLA PARA TESTE DAS PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA EXTERNA E TENSOATIVO.....	62

TABELA 11 - RESULTADO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS AMOSTRAS TESTADAS PARA ANÁLISE DA INFLUENCIA DA TEMPERATURA E ORDEM DE ADIÇÃO DA EMULSÃO PRIMARIA E A FASE AQUOSA EXTERNA APÓS 7 DIAS .....	66
TABELA 12 - VALORES OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE pH DA EMULSÃO MÚLTIPLA A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> DURANTE 28 DIAS .....	68
TABELA 13 - QUANTIDADE DE ÁCIDO GÁLICO PRESENTE NA EMULSÃO MÚLTIPLA(A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> ) DURANTE 28 DIAS .....	72
TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> DURANTE 28 DIAS .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EGCG	-	Epigallocatequina -3-galato
°C	-	Graus Celsius
ROS	-	<i>Reactive oxygen species</i> ( Espécies reativas de oxigênio)
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
pH	-	Potencial hidrogeniônico
Am	-	Amostra
PGPR	-	Poliglicero polirricinoleato
Log P	-	Coeficiente de partição óleo/água
pKa	-	Logaritmo negativo da constante de dissociação de um ácido
mL	-	Mililitros
g	-	Gramas
UV	-	Ultravioleta
A/O	-	Água-em-óleo
A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub>	-	Água-em-óleo-em-água
O/A	-	Óleo-em-água
O <sub>1</sub> /A/O <sub>2</sub>	-	Óleo-em-água-em-óleo
EHL	-	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
nm	-	nanômetro
A <sub>1</sub>	-	Fase aquosa interna
A <sub>2</sub>	-	Fase aquosa externa
CLAE	-	Cromatografia Líquida de alta eficiência
NaCl	-	Cloreto de sódio
CaCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de cálcio
MgSO <sub>4</sub>	-	Sulfato de magnésio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	Ácido fosfórico
LD	-	Limite de detecção
LQ	-	Limite de quantificação
DPR	-	Desvio padrão relativo
DP	-	Desvio padrão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1	POLIFENÓIS	18
2.1.1	Ácido gálico	23
2.1.1.1	Propriedades Físico-Químicas	23
2.1.1.2	Propriedades farmacocinéticas, terapêuticas e usos em geral	26
2.1.1.3	Polimorfismo	27
2.2	EMULSÃO	28
2.2.1	Definição	28
2.2.3	Fenômenos que podem ocasionar a desestabilização de emulsões	30
2.3	EMULSÃO MÚLTIPLA	31
2.3.1	Técnicas de preparo de emulsões múltiplas	33
2.3.2	Fatores que interferem na estabilidade das emulsões múltiplas	34
2.3.2.1	Influência da presença de tensoativos na interface	34
2.3.2.2	Influência de componentes osmoticamente ativos	35
2.3.2.3	Influência da presença de eletrólitos	35
2.3.2.4	Influência de aditivos estabilizantes	36
2.3.2.5	Influência da proporção de fases	37
2.3.2.6	Influência da natureza da fase oleosa	38
2.3.2.7	Influência da viscosidade	38
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	40
3.2	PARÂMETROS CRÍTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO	41
3.2.1	Solubilidade do ácido gálico	41
3.2.1.1	Determinação do comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda_{max}$ )	41
3.2.1.2	Solubilidade em água	41
3.2.1.3	Solubilidade em etanol	41
3.2.2	Desenvolvimento e validação do método de quantificação do ácido gálico por CLAE-UV	42
3.2.3	Análise da compatibilidade dos coexcipientes da fase aquosa interna	43
3.3	DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO PRIMÁRIA	44
3.3.1	Análise da estabilidade preliminar e microscopia	44
3.3.2	Seleção do tensoativo lipofílico	44
3.3.3	Seleção do sistema tamponante	45
3.3.4	Seleção do eletrólito para a fase aquosa interna	45
3.4	PREPARO DA EMULSÃO MÚLTIPLA	46
3.4.1	Análise de estabilidade preliminar e microscopia	46

3.4.2	Seleção do tensoativo para a segunda etapa de emulsificação e determinação do valor mais adequado de EHL e proporção de emulsão primária e fase aquosa externa .....	46
3.4.3	Seleção do polissacarídeo na fase aquosa externa da emulsão .....	47
3.4.4	Influência da temperatura e ordem de adição da emulsão primária a fase aquosa externa .....	47
3.5	ANÁLISE DA EMULSÃO MÚLTIPLA (A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> ) CONTENDO ÁCIDO GÁLICO .....	48
3.5.1	Determinação da viscosidade.....	48
3.5.2	Teste de estabilidade.....	48
3.5.2.1	Determinação do valor de pH .....	48
3.5.2.2	Estabilidade cinética .....	48
3.5.2.3	Determinação de fenóis totais .....	49
3.5.2.4	Determinação da atividade antioxidante por redução do complexo de fosfomolibdênio.....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1	PARÂMETROS CRÍTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO .....	50
4.1.1	Solubilidade do ácido gálico .....	50
4.1.1.1	Determinação do comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda_{max}$ ) .....	50
4.1.1.2	Solubilidade em água .....	51
4.1.1.3	Solubilidade em etanol .....	52
4.1.2	Validação analítica do método de quantificação por CLAE-UV .....	53
4.1.3	Análise da compatibilidade dos coexcipientes da fase aquosa interna .....	55
4.2	DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO PRIMÁRIA .....	56
4.2.1	Seleção do tensoativo lipofílico .....	56
4.2.2	Seleção do sistema tamponante .....	58
4.2.3	Seleção do eletrólito para a fase aquosa interna.....	59
4.3	PREPARO DA EMULSÃO MÚLTIPLA .....	61
4.3.1	Seleção do tensoativo hidrofílico para a segunda etapa de emulsificação e determinação do valor mais adequado de EHL e proporção de emulsão primária e fase aquosa externa.....	61
4.3.2	Seleção do polissacarídeo na fase aquosa externa da emulsão .....	63
4.3.3	Influência da temperatura e ordem de adição da emulsão primária a fase aquosa externa.....	66
4.4	ANÁLISE DA EMULSÃO MÚLTIPLA CONTENDO ÁCIDO GÁLICO .....	66
4.4.1	Determinação da viscosidade.....	66
4.4.2	Teste de estabilidade.....	68
4.4.2.1	Determinação do valor de pH .....	68
4.4.2.2	Estabilidade cinética .....	69
4.4.2.3	Determinação de fenóis totais .....	71
4.4.2.4	Determinação da atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio.....	73
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os polifenóis apresentam potente ação antioxidante e estão abundantemente presentes no reino vegetal (CHOI et al., 2012; CLERGEAUD et al., 2016). Porém, um fato limitante da sua aplicação na terapêutica é a baixa biodisponibilidade e instabilidade durante o processo de digestão e absorção (LU; KELLY; MIAO, 2015).

Entre as diversas classes de polifenóis, há a classe dos hidroxiácidos, composta pelos ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatequínico, vanílico e siríngico (BALASUNDRAM et al., 2006). Destes, o ácido gálico possui conhecida ação antioxidante (FERK et al., 2011), prevenindo diversas doenças e combatendo tumores (SENAPATHY et al., 2011), mas devido a sua alta capacidade de se oxidar apresenta uma baixa estabilidade, tornando difícil sua utilização na terapêutica.

Alguns autores desenvolveram métodos para aumentar a aplicabilidade do ácido gálico, por exemplo, a complexação com fosfolipídios (SINGH et al., 2011); a microencapsulação por meio de *spray-drying* com mucilagem de nopal (MEDINA-TORRES et al., 2013), amido acetilado, inulina (ROBERT et al., 2012); conjugação com quitosana (PASANPHAN; CHIRACHANCHAI, 2008) emulsões óleo/água e água/óleo (GOMES et al., 2016); coencapsulação com o ácido ferúlico em hp- $\beta$ -ciclodextrina (OLGA et al., 2015) e microencapsulação por meio de liofilização em quitosana,  $\beta$ -ciclodextrina e goma xantana (ROSA et al., 2013).

Entre as formas de aumentar a estabilidade de um ativo há o desenvolvimento de formulações que são capazes de o proteger do meio externo e assim evitar sua oxidação. Neste contexto, a emulsão múltipla é uma forma farmacêutica promissora, pois nela é possível incorporar ativos e promover uma liberação controlada e aumentar a estabilidade.

As emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) possuem glóbulos de óleo que contém pequenos glóbulos de água dispersos em uma fase aquosa contínua. A composição dessa forma farmacêutica permite muitas aplicações potenciais, tais como o aprisionamento de compostos hidrofílicos, a partição de substâncias incompatíveis, a melhoria do desempenho de compostos, a liberação controlada desses ativos e a proteção (KAIMAINEN et al., 2015; DELAMPLE et al., 2014).

Sendo assim, esta pesquisa justifica-se pelo desenvolvimento de uma emulsão múltipla água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) capaz de aumentar a estabilidade do ácido gálico permitindo sua aplicabilidade.

## 1.1 OBJETIVOS

- OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma emulsão múltipla água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) para o carreamento do ácido gálico para fins farmacêuticos e/ou alimentares.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a solubilidade do ácido gálico em água e etanol por meio de espectrofotômetro de luz ultravioleta;

Verificar a compatibilidade entre os coexcipientes da fase aquosa interna e o ácido gálico por meio de metodologia de CLAE-UV desenvolvida e validada;

Desenvolver uma emulsão primária água-em-óleo ( $A_1/O$ ) com o ácido gálico na fase aquosa interna;

Desenvolver uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  com o ácido gálico presente na fase aquosa interna e avaliar os fatores para estabilização do sistema;

Avaliar o índice de estabilidade (28 dias) e a viscosidade da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo o ácido gálico;

Determinar a quantidade de fenóis totais presentes na emulsão múltipla;

Determinar a capacidade antioxidante da emulsão múltipla por meio do teste de redução do complexo de fosfomolibdênio semanalmente durante 28 dias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POLIFENÓIS

Os polifenóis constituem uma classe estrutural de origem sintética, semissintética ou principalmente natural, amplamente distribuídos em plantas e alimentos naturais (LU; KELLY; MIAO, 2015), os quais derivam das vias de pentose-fosfato, do ácido chiquímico e dos fenilpropanoides (BALASUNDRAM et al., 2006). São compostos químicos orgânicos que se caracterizam pela presença de grandes unidades estruturais de fenol (CARDONA et al., 2013; LU; KELLY; MIAO, 2015; CHANG et al., 2016).

Em geral, estes compostos têm uma baixa solubilidade em água, mas podem ser facilmente dissolvidos em solventes orgânicos, exceto a epigalocatequina-3-galato (EGCG), que é solúvel em ambos. São frequentemente cristais coloridos ou pós, com ponto de fusão variando entre 183°C (curcumina) e 360°C (ácido elágico) (LU; KELLY; MIAO, 2015).

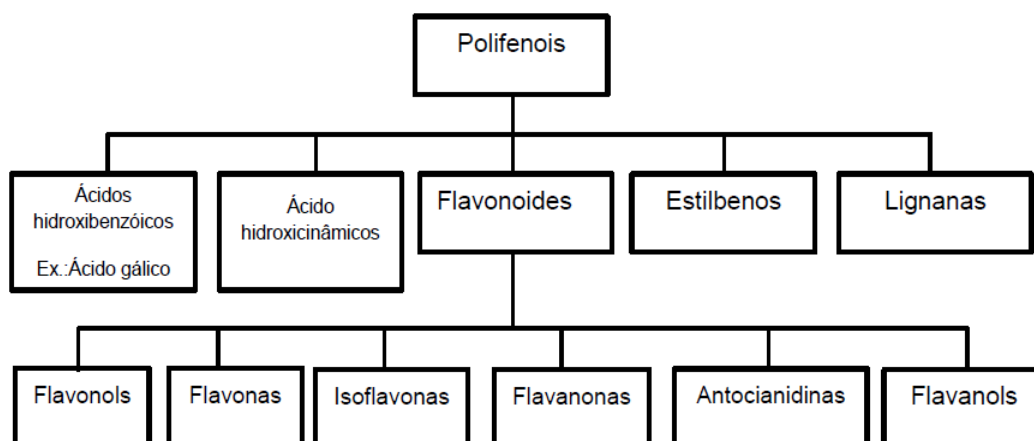
Nas plantas encontram-se normalmente na forma glicosilada, porém, podem ocorrer com modificações como esterificação e polimerização (CARDONA et al., 2013), ou seja, possuem estruturas moleculares bem diversas, de moléculas simples a moléculas com alto grau de complexidade (ROSA, 2012), conforme apresentado no QUADRO 1 e na FIGURA 1.

QUADRO 1 - RELAÇÃO CLASSE E ESTRUTURA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

CLASSE	ESTRUTURA
Fenóis simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6-C_1$
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenes)	$C_6-C_3$
Naftoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonas	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

FONTE: Adaptado de BALASUNDRAM et al. (2006)

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS



FONTE: Adaptada de LU; KELLY; MIAO (2015)

São considerados um dos principais grupos de compostos antioxidantes, uma vez que exibem potente capacidade de eliminação de radicais livres, proteção contra a peroxidação lipídica e a oxidação de metais de transição (CHOI et al., 2012; CLERGEAUD et al., 2016).

O processo de estresse oxidativo ocorre quando a molécula de  $O_2$ , que naturalmente possui elétrons desemparelhados, comporta-se como um radical que ataca íons de metais de transição e radicais livres naturalmente presentes no organismo. Assim, inicia a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e reações em cadeia, que podem atacar moléculas como enzimas, proteínas, DNA e lipídios. A presença de excesso de EROs no organismo é responsável por diversos danos, como por exemplo a superativação de algumas vias intracelulares, o que resulta no aparecimento de diversas doenças (ROSA, 2012).

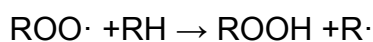
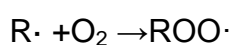
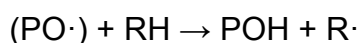
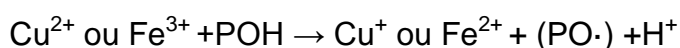
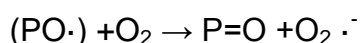
Os compostos antioxidantes são capazes de retardar, inibir e até evitar a oxidação por meio da inativação dos radicais livres, o que consequentemente resulta em diminuição do estresse oxidativo. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos pode ser avaliado por meio da capacidade de inativar radicais livres, inibir a formação de EROs ou ainda de proteger as defesas antioxidantes (ROSA, 2012).

Os ácidos fenólicos, os quais são compostos pelos ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos, têm sua ação antioxidante dependente da posição e do número de grupos hidroxilas em relação a posição do grupo funcional carboxílico. A atividade antioxidante aumenta quanto maior o número de hidroxilas nos ácidos fenólicos, como no ácido gálico que demonstra uma alta capacidade antioxidante (BALASUNDRAM et al., 2006).

A presença da hidroxila fenólica permite que a molécula doe um átomo de hidrogênio ou um elétron para o radical livre e assim o estabilize por ressonância do anel (1). O radical originado dessa primeira reação é o intermediário fenóxi (PO·), que é consideravelmente estável, pois ocorre a estabilização do elétron pelo anel aromático por meio de ressonância, dificultando que ocorra uma reação em cadeia. O radical fenóxi também é capaz de reagir com outros radicais para interromper a propagação (2) (ROSA, 2012).



Outro mecanismo apresentado pelos polifenóis é a atividade como pró-oxidantes. Neste caso, eles atuam como oxidantes de moléculas alvo quando há condições que favoreçam a auto-oxidação desses compostos, como elevado pH do meio, presença de íons de metais de transição e oxigênio. As moléculas que evidenciam esta atividade são as de baixo peso molecular, como o ácido gálico e a quercetina (ROSA, 2012). Assim, ao invés de ocorrer o término da reação em cadeia após a redução do radical livre acontece a formação de mais radicais livres (3) (ROSA, 2012).



Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam um alto poder antioxidante quando comparado aos ácidos hidroxibenzoicos correspondentes, isso ocorre devido ao grupo CH=CH-COOH, que garante uma grande capacidade de doação do próton e estabilização do grupamento carboxílico (-COOH) (BALASUNDRAM et al., 2006).

A capacidade quelante de metais apresentada pelos polifenois auxilia na função antioxidante por impedir a formação de radicais livres induzidos por metais. A oxidação causada por metais ocorre quando íons metálicos ativos, por exemplo, o

cobre ( $\text{Cu}^+$ ) ou o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), interagem com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formando o radical  $\text{OH}\cdot$  (hidroxila), o qual consegue iniciar reações em cadeia. Algumas moléculas que possuem grupamentos catecois e galatos conseguem formar complexos inativos com os metais, evitando a oxidação (ROSA, 2012).

Os polifenóis podem inibir a proliferação de células cancerosas (CARDONA et al., 2013; LEÓN-GONZÁLEZ et al., 2015), desordens neurodegenerativas (CHOI et al., 2012), absorção de colesterol (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008; SANZ-BUENHOMBRE et al., 2016) e reduzir as respostas angiogênicas (CALABRISO et al., 2015). Também possuem atividade antimicrobiana (CARDONA et al., 2013; BORRÁS-LINARES et al., 2015), atuam na prevenção e tratamento da osteoporose (LUKA et al., 2015) e regulam a transcrição, expressão e modo de ação de diferentes receptores reguladores nos níveis de colesterol (SANZ-BUENHOMBRE et al., 2016). Participam em várias vias de transdução de sinal, modulam o ciclo celular e funções plaquetárias (LU; KELLY; MIAO, 2015) e ativam fatores de transcrição, como o Nrf2 (fator responsável por ativar genes citoprotetores) (BAYELE et al., 2016). Os polifenóis podem prevenir disfunções endoteliais (CARLUCCIO et al., 2016), o envelhecimento actínico, atuar como anti-inflamatório, antialérgico, antibacteriano e antiviral, como é o caso das proantocianidinas quando usadas por via tópica (ANDRY et al., 1998).

Os polifenóis podem atuar de forma positiva na prevenção de diabetes, inflamação, trombos, doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer, além de proteger contra efeitos das radiações ultravioleta e apresentar atividades hepatoprotetoras, sendo esses efeitos protetores associados a sua capacidade de combater radicais livres (LU; KELLY; MIAO, 2015).

No entanto, a baixa biodisponibilidade e instabilidade dos polifenóis durante o processo de digestão e absorção limitam os seus benefícios para a saúde. Pois, devido ao seu baixo tempo de permanência gástrica, a baixa permeabilidade e a baixa solubilidade em água, apenas uma pequena porção deles é absorvida quando administrada por via oral (LU; KELLY; MIAO, 2015). Ainda, são compostos sensíveis às condições químicas e físicas, tais como a luz, calor e oxidação (FANG; BHANDARI, 2010). Sendo assim, a disponibilidade destes compostos requer mecanismos de proteção que possam manter a sua integridade química e distribuição até o sítio específico (LU; KELLY; MIAO, 2015).

Várias técnicas para a encapsulação de polifenóis foram desenvolvidas, entre elas, *spray-drying*, coacervação, lipossomas, micelas, inclusão em ciclodextrinas, nanopartículas, liofilização, cocrystalização, nanoencapsulação, encapsulação em levedura e emulsão (FANG; BHANDARI, 2010). Cada uma das técnicas possui pontos fortes e fracos em encapsulação, proteção, liberação, custo, regulamentação, facilidade de uso, biodegradabilidade e biocompatibilidade (LU; KELLY; MIAO, 2015).

A técnica de *spray-drying* apresenta como grande vantagem baixo custo, flexibilidade e resulta em partículas de boa qualidade, por isso é amplamente utilizada na indústria alimentar, porém, uma grande limitação é o número de materiais disponíveis para encapsulação, que devem apresentar como principal característica boa solubilidade em água (FANG; BHANDARI, 2010).

A coacervação por sua vez apresenta uma boa biocompatibilidade e simples técnica de preparo, porém custo alto para a indústria alimentícia. Os lipossomas são capazes de controlar a liberação e a direcionar para o local desejado, porém uma limitação que afeta sua eficiência é o material utilizado na sua produção. A inclusão em ciclodextrinas permite uma melhoria na solubilidade do composto encapsulado, sendo muito útil para produtos pouco solúveis em água, por outro lado, assim como os lipossomas, apresenta limitação quanto ao seu material constituinte (FANG; BHANDARI, 2010).

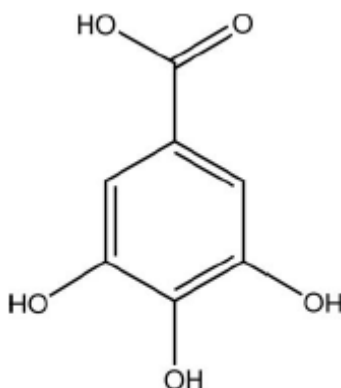
A cocrystalização é capaz de melhorar a solubilidade, a umectabilidade, a homogeneidade, a dispersibilidade, a hidratação, a antiaglutinação, a estabilidade e a fluidez dos materiais encapsulados, porém, como a técnica utiliza açúcares, esses podem sofrer fácil degradação. A nanoencapsulação proporciona uma maior área de superfície melhorando assim a solubilidade e a liberação, porém, geralmente apresenta custo elevado. A liofilização é uma técnica simples, mas é necessário um longo tempo de secagem que limita sua utilização. A encapsulação em leveduras permite a proteção do ativo contra evaporação, extrusão, oxidação e luz, no entanto é utilizada apenas para pequenas moléculas. As emulsões apresentam como limitação a dificuldade de estabilização devido a presença de duas fases imiscíveis na formulação o que também permite a encapsulação de diferentes ativos (FANG; BHANDARI, 2010).

## 2.1.1 Ácido gálico

### 2.1.1.1 Propriedades Físico-Químicas

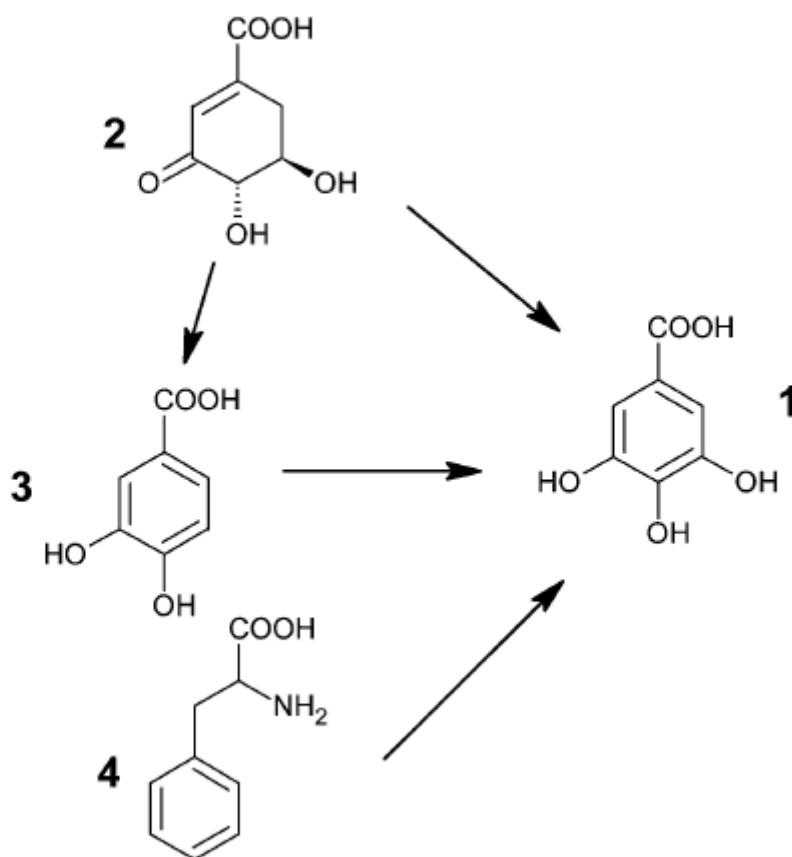
O ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico ( $C_6H_2(OH)_3COOH$ ), conhecido como ácido gálico (FIGURA 2), é um ácido orgânico que possui na sua estrutura um anel benzênico substituído por três hidroxilas e por um grupamento carboxila, com massa molecular de  $170,12 \text{ g.mol}^{-1}$  (GRUNDHÖFER et al., 2001).

FIGURA 2 - FORMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO GÁLICO (ÁCIDO 3,4,5-TRIHIDROXIBENZÓICO)



Vários estudos indicam que o ácido gálico pode ter sua origem por meio de duas rotas biossintéticas, podendo ser formado a partir da fenilalanina ou da rota do ácido chiquímico, partindo do intermediário ácido 3-desidrochiquimato (3-DHS). O grupamento carboxílico presente no ácido gálico mostrou-se biossinteticamente equivalente ao presente no chiquimato, indicando que o ácido gálico é formado por desidrogenação direta do 3-DHS ou ainda do ácido protocatequínico, ao invés da cadeia lateral da fenilalanina (FIGURA 3). Alguns estudos demonstram que as duas rotas de síntese do ácido gálico podem estar presentes em uma mesma espécie vegetal (BADHANI et al., 2015).

FIGURA 3 - POSSÍVEIS ROTAS PARA A BIOSÍNTESE DO ÁCIDO GÁLICO



FONTE: BADHANI et al. (2015)

NOTA: 1= ácido gálico 2= 3-ácido desidrochiquimico, 3= ácido protocatequínico, 4= fenilalanina.

O ácido gálico está amplamente presente no reino vegetal em sua forma livre ou ligado a taninos hidrolisáveis, sendo obtido principalmente por meio da hidrólise ácida de taninos (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013). Apresenta coeficiente de partição óleo/água ( $\log P$ ) 0,89, indicando boa solubilidade em solventes aquosos (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013). É solúvel em água a concentrações de 0,1 a 1,3% (m/m) e seu pH varia de 3,3 para 2,8 na faixa de 0,1 e 1,0% (m/m) (GOMES et al., 2016).

O ácido gálico apresenta  $pK_{a1}$ = 4,4 e  $pK_{a2}$ = 8,5, sendo o  $pK_{a1}$  correspondente a perda do hidrogênio do grupamento carboxila e o  $pK_{a2}$  ao hidrogênio do grupamento hidroxila na posição *para* (SLAWINSKA; POLEWSKI; SLAWINSKI, 2007). Segundo Eslami et al. (2010), o ácido gálico possui a

capacidade de doar quatro prótons com os seguintes valores de pKa, 4,0; 8,7; 11,4 e >13.

O ácido gálico não apresenta ação sobre a tensão interfacial em emulsões, porém na presença de surfactantes é capaz de auxiliar na formação de gotículas menores (GOMES et al., 2016).

A solubilidade molar do ácido gálico diminui na seguinte ordem dos solventes: metanol, etanol, água e acetato de etila (DANESHFAR et al., 2008). O QUADRO 2 apresenta os valores de solubilidade para o ácido gálico determinada por diversos autores.

QUADRO 2 - SOLUBILIDADE DO ÁCIDO GÁLICO EM METANOL, ETANOL, ÁGUA E ACETATO DE ETILA DE 293,2 – 333,2 K

TEMPERATURA		g DE ÁCIDO GÁLICO (±DP)EM 100 mL DE METANOL	g DE ÁCIDO GÁLICO (±DP)EM 100 mL DE ETANOL	g DE ÁCIDO GÁLICO (±DP)EM 100 mL DE ÁGUA	g DE ÁCIDO GÁLICO (±DP)EM 100 mL DE ACETATO DE ETILA )
°C	K				
20	293,2	-	-	0,96 (±0,01) <sup>[1]</sup> , 1,0099 <sup>[4]</sup>	-
25	298,2	27,93 (±0,29) <sup>[2]</sup>	18,90 (±0,22) <sup>[2]</sup>	1,00 (±0,02) <sup>[1]</sup> , 1,516 (±0,021) <sup>[2]</sup> , 1,47 (±0,08) <sup>[3]</sup> , 1,3527 <sup>[4]</sup> .	1,276 (±0,020) <sup>[2]</sup>
30	303,2	28,83 (±0,29) <sup>[2]</sup>	18,94 (±0,21) <sup>[2]</sup>	1,38(±0,01) <sup>[1]</sup> , 1,615 (±0,021) <sup>[2]</sup> , 1,86(±0,09) <sup>[3]</sup> , 1,7060 <sup>[4]</sup> ,	1,290 (±0,021) <sup>[2]</sup>
35	308,2	29,30 (±0,30) <sup>[2]</sup>	19,00 (±0,22) <sup>[2]</sup>	1,79 (±0,01) <sup>[1]</sup> , 2,367 (±0,021) <sup>[2]</sup> , 2,2661 <sup>[4]</sup>	1,303 (±0,020) <sup>[2]</sup>
40	313,2	29,59 (±0,30) <sup>[2]</sup>	19,17 (±0,23) <sup>[2]</sup>	2,36 (±0,02) <sup>[1]</sup> , 2,549 (±0,023) <sup>[2]</sup> , 2,64 (±0,12) <sup>[3]</sup> , 2,8901 <sup>[4]</sup> .	1,335 (±0,021) <sup>[2]</sup>
45	318,2	30,13(±0,30) <sup>[2]</sup>	19,55 (±0,24) <sup>[2]</sup>	3,07 (±0,05) <sup>[1]</sup> , 3,429 (±0,026) <sup>[2]</sup> , 3,7984 <sup>[4]</sup>	1,438 (±0,023) <sup>[2]</sup>
50	323,2	30,48 (±0,32) <sup>[2]</sup>	20,02 (±0,24) <sup>[2]</sup>	4,02 (±0,06) <sup>[1]</sup> , 3,820 (±0,026) <sup>[2]</sup> , 3,89 (±0,21) <sup>[3]</sup>	1,544 (±0,023) <sup>[2]</sup>
55	328,2	31,07(±0,33) <sup>[2]</sup>	20,45 (0,24) <sup>[2]</sup>	5,15 (±0,06) <sup>[1]</sup> , 4,787 (±0,026) <sup>[2]</sup> ,	1,598 (±0,024) <sup>[2]</sup>
60	333,2	31,74 (±0,33) <sup>[2]</sup>	20,93 (0,25) <sup>[2]</sup>	6,86 (±0,06) <sup>[1]</sup> , 7,378 (±0,037) <sup>[2]</sup> ,	1,689 (±0,024) <sup>[2]</sup>

FONTE: LU; LU (2007)<sup>[1]</sup>; DANESHFAR et al. (2008)<sup>[2]</sup>; MOTA et al. (2008)<sup>[3]</sup>; NOUBIGH et al. (2013)<sup>[4]</sup>

### 2.1.1.2 Propriedades farmacocinéticas, terapêuticas e usos em geral

Em estudo realizado por Koyama e Bitsch (2001) para avaliar a farmacocinética do ácido gálico, o qual foi administrado na forma de comprimidos e tabletes, o tempo de absorção para ambas as formas foi considerado curto,  $1,27 \pm 0,20$  h quando na forma de comprimidos e  $1,39 \pm 0,21$  h quando na forma de chá. Com relação a excreção do ácido gálico e de seu metabólito 4-O-metil ácido gálico (4OMGA) a porcentagem localizada na urina foi  $36,4 \pm 4,5\%$  para o ácido gálico em tabletes e  $39,6 \pm 5,1\%$  para o chá (KOYAMA e BITSCH, 2001). Por via oral o ácido gálico possui uma meia vida de 1,19 hora e 1,06 hora, quando ingerido em forma de comprimidos ou chá preto, respectivamente (SHAHRZAD et al., 2001).

É um potente agente antioxidante, possuindo ação protetora contra danos causados pelo estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas (MANSOURI et al., 2013), como Parkinson e Alzheimer, protegendo os linfócitos do ataque de EROs (FERK et al., 2011) e diminuindo a peroxidação lipídica (LI et al., 2005).

Em estudo realizado por Priscilla e Prince (2009) foi avaliada a atividade cardioprotetora do ácido gálico frente a indução de dano cardíaco por isoproterenol, ocorrendo a diminuição nos níveis séricos de marcadores de lesão cardíaca no grupo de animais tratados com ácido gálico, demonstrando que esse apresenta ação protetora.

Punithavathi et al. (2011) testaram a ação do ácido gálico em diabetes, induzida em ratos por estreptozotocina. Os efeitos anti-hiperglicêmico, antiperoxidação lipídica e antioxidante do ácido gálico fizeram com que o tecido pancreático fosse preservado e protegido da toxicidade induzida por estreptozotocina.

O ácido gálico apresenta ação antitumoral por meio de vários mecanismos moleculares atuando no ciclo celular, no processo de apoptose, na angiogênese, na capacidade invasiva e de metastase. Tais efeitos são possíveis porque ele possui ação nas rotas de sinalização ATM quinase, ADAM17, COX, ribonucleótideo redutase, UGDH, Bax/Bcl-2, NF- $\kappa$ B e vegf / vegfR (VERMA et al., 2013). Em tumores de cólon reduz a incidência, a multiplicação das células e o tamanho do tumor (SENAPATHY et al., 2011) e em carcinoma gástrico ocasiona a diminuição das metástases e da capacidade invasiva do tumor por meio da indução de RhoB, regulação negativa de AKT/small GTPase e inibição da NF- $\kappa$ B (HO et al., 2013).

Quando avaliado o efeito sobre células de carcinoma hepático (HepG2), ocorreu a redução da proliferação celular de maneira dose e tempo dependente (LIMA, 2014).

Apresenta ação sobre as células estreladas hepáticas, ativando a cascata  $Ca^{2+}$ /calpain I induzindo a morte celular e assim evitando que ocorra a diferenciação destas células em miofibroblastos e consequente fibrose hepática (HSIEH et al., 2014).

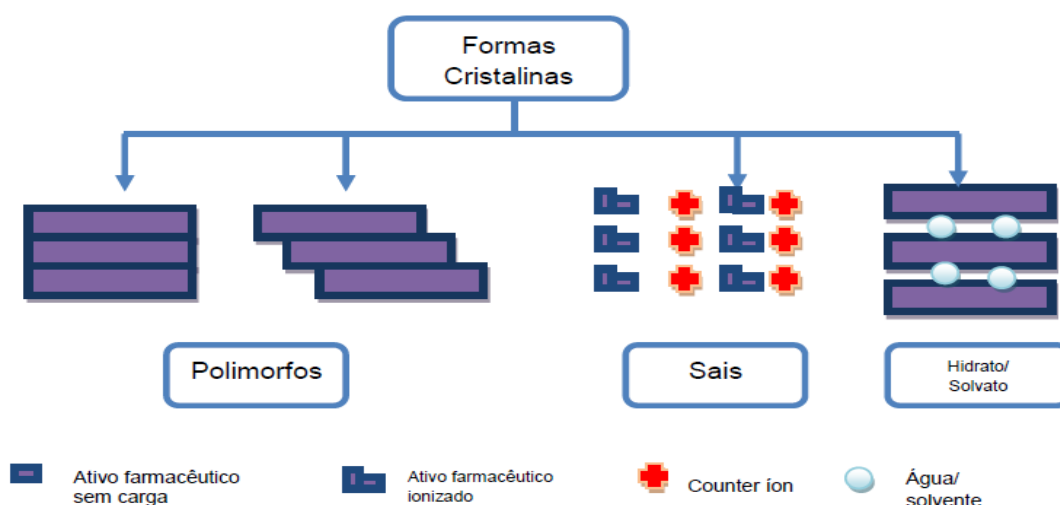
Possui propriedade antiofídica por meio da complexação com a miotoxina (BthTX-I) presente na peçonha de *Bothrops jararacussu* e inibição da atividade da enzima fosfolipase A2 (COSTA, 2010). Apresenta atividade bactericida frente a *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans* na concentração mínima  $8\text{mg. mL}^{-1}$ , sendo mais ativo contra bactérias gram negativas (SHAO et al., 2015).

O ácido gálico pode ser utilizado como agente de clareamento de pele e em doenças hiperpigmentárias, essa ação ocorre por meio da inibição de genes reguladores melanogênicos, incluindo a tirosinase, TRP-1, Dct e MITF; pela regulação negativa da rota do AMPcíclico e pela ativação das quinases ERK e AKT; além de reverter a hiperpigmentação induzida por raios UVB (KUMAR et al., 2013).

### 2.1.1.3 Polimorfismo

Os ativos farmacêuticos podem apresentar formas cristalinas diferentes como polimorfos, sais, hidratos ou solvatos (DAWN; CLARKE, 2012). Na FIGURA 4, essas formas cristalinas são ilustradas.

FIGURA 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS DIFERENTES TIPOS DE CRISTAIS



FONTE: Adaptado de DAWN; CLARKE (2012)

As substâncias possuem a habilidade de existir no estado sólido em pelo menos duas estruturas cristalinas diferentes e essa habilidade é chamada de polimorfismo. Portanto cada polimorfo de uma substância é uma das suas formas cristalinas. De modo geral todos os fármacos têm a capacidade de cristalizar em formas diferentes, o que originaria diversos polimorfos, porém isso nem sempre ocorre devido a barreiras cinéticas e termodinâmicas (ARAUJO et al., 2012).

O polimorfismo é capaz de alterar diversas propriedades como densidade, solubilidade, dureza, ponto de fusão, resistência mecânica, entre outras. Além de interferir na forma de produção, na atividade e na estabilidade de produtos que contenham estes polimórficos (BRAUN et al., 2013).

Segundo Braun et al. (2013), o ácido gálico possui dois polimorfos monohidratados na *Cambridge Structural Database* com os códigos de referência KONTIQ (forma MH-IV) e KONTIQ01 / 02 (forma MH-I °). O ácido gálico anidro também possui formas polimórficas apesar de somente uma estrutura ter sido publicada, IJUMEG (forma AH-II°) (BRAUN et al., 2013).

Clarke et al. (2011) utilizando de estudos computacionais caracterizaram as formas polimórficas monohidratadas III e IV. Também utilizando de cálculos computacionais e experimentos laboratoriais, Braun et al. (2013) encontraram e caracterizaram dois polimorfos anidros (AH-I7 e AH-III), o quinto monohidratado (MH-V) e 22 solvatos (sendo a maioria com solventes misturados a água). A presença de diversos polimorfos anidros e monohidratados justifica a sensibilidade deste composto a pequenas variações de temperatura, umidade e pureza do produto, pois ocorrem alterações entre a disposição das moléculas na estrutura cristalina (BRAUN et al., 2013).

## 2.2 EMULSÃO

### 2.2.1 Definição

As emulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, geralmente água e solvente orgânico, onde é adicionado um agente tensoativo capaz de auxiliar a formação de uma interface estável entre esses dois líquidos. Podem ser classificadas em dois tipos, óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O) (LV et al., 2014).

Ao desenvolver uma emulsão, um dos principais focos é a obtenção de um produto estável, capaz de resistir às mudanças na sua aparência ao longo do tempo. Para isso, uma emulsão cineticamente estável (metaestável) possui em sua composição óleo, água e um tensoativo, também chamado de agente emulsionante ou estabilizador (ABDOLMALEKI et al., 2016).

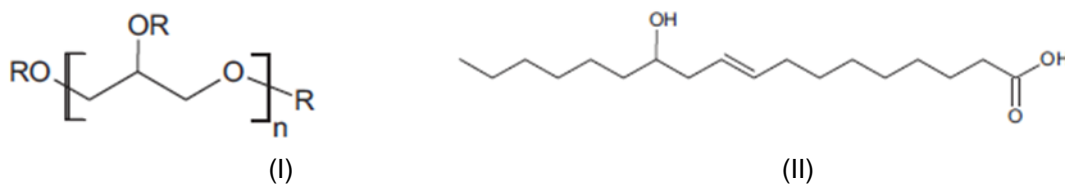
Os tensoativos são moléculas que possuem em sua estrutura uma porção hidrofílica (polar) e uma porção lipofílica (apolar), que lhe conferem a capacidade de atuar na interface de fases oleosa e aquosa, permitindo a formação de emulsões (GRIFFIN, 1949).

Em 1949, Griffin definiu um valor para o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) com base na estrutura molecular, sendo que este se correlaciona com a afinidade do tensoativo pela fase oleosa ou aquosa. Ou seja, é a influência que a porção polar ou apolar tem sobre o comportamento da molécula tensoativa, assim o tipo da emulsão A/O ou O/A dependerá diretamente do tensoativo utilizado. Os tensoativos hidrofílicos possuem valores altos de EHL (8-18), enquanto que os tensoativos lipofílicos possuem valores baixos (4-6) (GRIFFIN, 1949).

O poliglicerol polirricinoleato (PGPR) (FIGURA 5) é um tensoativo lipofílico de origem sintética com EHL de 1,5-2,0, amplamente utilizado para o preparo de emulsões A/O e emulsões múltiplas A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> (GÜLSEREN; CORREDIG, 2012). É um emulsificante não iônico e oligomérico produzido a partir da esterificação do poliglicerol com óleo de rícino (USHIKUBO; CUNHA, 2014).

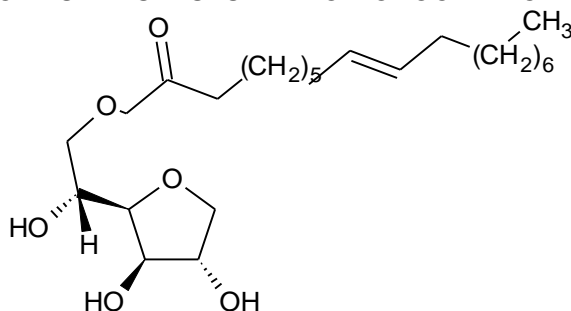
O monooleato de sorbitano (FIGURA 6) pertence a classe dos ésteres graxos de sorbitano, sendo um tensoativo monomérico e não-iônico. Apresenta, assim como o PGPR, um baixo valor de EHL (equivalente a 4,3) e é obtido pela reação entre o sorbitol e ácidos graxos (USHIKUBO; CUNHA, 2014).

FIGURA 5 - FORMULA ESTRUTURAL DO POLIGLICEROL POLIRRICINOLEATO



NOTA: (I) Fórmula de PGPR, na qual R é um hidrogênio, ácido ricinoleico ou ácido polirricinoleico. (II) Fórmula de ácido ricinoleico.

FIGURA 6 - FORMULA ESTRUTURAL DO MONOOLEATO DE SORBITANO

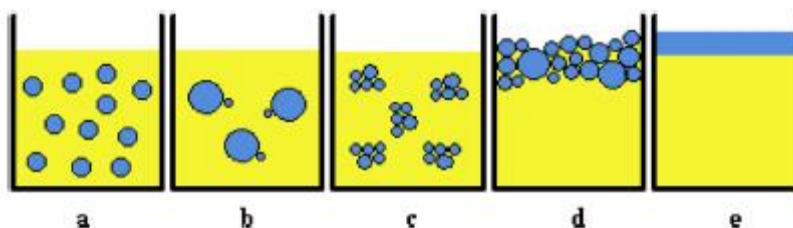


De acordo com Lv et al. (2014), existem diversos tipos de métodos para o preparo de emulsão e podem ser classificados de acordo com a quantidade de energia necessária. Existem os métodos que necessitam de alta energia, nesses para a emulsificação são utilizados equipamentos que fornecem energia mecânica intensa e os três mais utilizados são os agitadores de alto cisalhamento, os homogeneizadores de alta pressão e os equipamentos de ultrassom. Por outro lado há os métodos que requerem baixa energia para que ocorra a emulsificação, esses métodos utilizam da energia presente no sistema, ocorrendo espontaneamente a reorganização dos tensoativos formando os glóbulos da fase interna da emulsão (LV et al., 2014).

### 2.2.3 Fenômenos que podem ocasionar a desestabilização de emulsões

Os fenômenos de instabilidade estão exemplificados por meio de esquemas na FIGURA 7. Os principais fenômenos de instabilidade que afetam as emulsões são coalescência, floculação, cremação, sedimentação, inversão de fases e maturação de Ostwald (TADROS, 2009).

FIGURA 7 - FENÔMENOS DE INSTABILIDADE EM EMULSÕES.



Fonte: Adaptado de LU et al. (2015)

NOTA: (a)-emulsão estável;(b)- coalescencia; (c)-floculação; (d)-cremação; (e)- quebra da emulsão.

A coalescência (FIGURA 7b) é o fenômeno de agregação dos glóbulos pequenos e formação de glóbulos maiores o que resulta na heterogeneidade da emulsão e desestabilização do sistema. A floculação (FIGURA 7c) por sua vez é a agregação dos glóbulos sem que haja a perda da estrutura da interface, formando aglomerados de glóbulos (TADROS, 2009).

Na cremação (FIGURA 7d) os glóbulos dispersos na emulsão tendem a subir para a parte superior do recipiente ocorrendo uma distribuição heterogênea ao longo da fase dispersante, desestabilizando o sistema. De modo inverso ocorre a sedimentação na qual os glóbulos se depositam no fundo do recipiente. Isto ocorre devido a densidade da fase dispersa, quando a densidade da fase dispersante for menor pode levar a cremação e se maior a sedimentação (ROBINS, 2000; TADROS, 2009).

A inversão de fases é o processo pelo qual uma mudança na energia livre de uma emulsão faz com que ela inverta a fase dispersa e a fase dispersante, ou seja, uma emulsão inicialmente A/O torna-se uma emulsão O/A (LV et al., 2014).

A maturação de Ostwald consiste na difusão dos pequenos glóbulos da emulsão para os glóbulos maiores, por meio da coalescência dos glóbulos resultando em emulsões menos estáveis (TADROS et al., 2004).

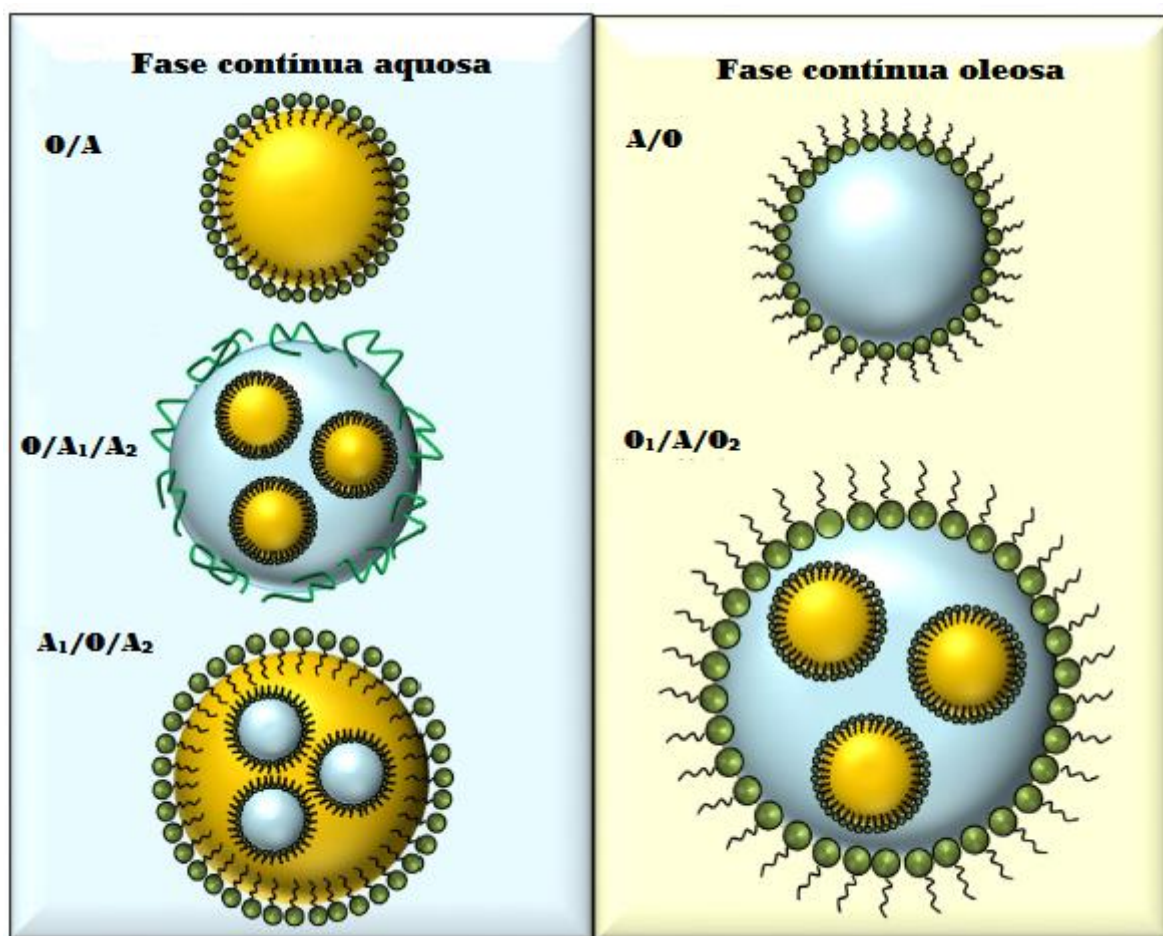
Os fenômenos de instabilidade podem ocasionar a separação de fases da emulsão, ou seja, a quebra da emulsão (FIGURA 7e).

### 2.3 EMULSÃO MÚLTIPLA

As emulsões múltiplas são sistemas complexos de multifases que consistem de uma emulsão na qual as gotículas são por si só uma emulsão, ou seja, os glóbulos dispersos possuem em seu interior glóbulos menores também dispersos. Existem dois tipos principais de emulsões múltiplas: água-em-óleo-em-água ( $A_1/O/A_2$ ) e óleo-em-água-em-óleo ( $O_1/A/O_2$ ). Na emulsão  $A_1/O/A_2$  a fase dispersante é a água que contém glóbulos de óleos dispersos e nesses glóbulos oleosos há glóbulos menores de água dispersos e esse sistema é estabilizado pela presença de agentes surfactantes entre as interfaces das fases oleosa e aquosa. As emulsões  $O_1/A/O_2$  por sua vez têm a fase dispersante oleosa que possui em seu interior glóbulos de água com glóbulos oleosos no interior. Apesar de menos frequente, também existem as emulsões óleo-em-água-em-água ( $O/A_1/A_2$ ). Na FIGURA 8 estão

representadas esquematicamente as diferentes estruturas das emulsões. (AKHTAR et al., 2010; COLE; WHATELEY, 1997; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013; OMOTOSHO, 1990; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; SCHMIDTS et al., 2009; SCHMIDT et al., 2015; SCHMIDTS et al., 2010; TABATABAEE AMID; MIRHOSSEINI, 2014).

FIGURA 8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE EMULSÕES SIMPLES E MÚLTIPLAS



FONTE: Adaptado de Chung; McClements (2014)

NOTA: O/A: Emulsão simples óleo-em-água; A/O: Emulsão simples água-em-óleo; O/A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>: Emulsão múltipla óleo-em-água-em-água; O<sub>1</sub>/A/O<sub>2</sub>: Emulsão múltipla óleo-em-água-em-óleo; A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>: Emulsão múltipla água-em-óleo-em-água.

As emulsões múltiplas A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> apresentam algumas vantagens em relação as emulsões simples, tais como a capacidade de reduzir o teor de gordura, mascarar o sabor e proteger contra agentes que causam instabilidade. Porém, um dos grandes problemas das emulsões múltiplas é a estabilização devido à difusão das moléculas de água entre a fase aquosa interna e externa da emulsão ou a coalescência dos glóbulos (LEAL-CALDERON et al., 2007).

Aditya et al. (2015a) desenvolveram uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  para o carregamento dos polifenóis curcumina e catequina, sendo um solúvel na fase lipídica e o outro na fase aquosa, respectivamente, visando a produção de uma forma farmacêutica que possibilitasse a ação sinérgica e aumentasse a estabilidade desses compostos. Na referida emulsão foram utilizados como tensoativos o poliglicerol polirricinoleato (PGPR) e o polisorbato 80; na fase aquosa interna ( $A_1$ ) foram adicionados água destilada, gelatina, cloreto de sódio e ácido ascórbico; utilizando como veículo da fase oleosa o azeite de oliva; e na fase aquosa externa ( $A_2$ ) foram utilizados água destilada, ácido ascórbico e cloreto de sódio.

Cofrades et al. (2013) desenvolveram uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  para aplicação em produtos cárneos com o intuito de obter uma formulação composta apenas de componentes seguros e o enriquecimento com lipídios saudáveis, utilizando o azeite de oliva, poliglicerol polirricinoleato (PGPR), caseinato de sódio e *whey protein*.

Bou et al. (2014) encapsularam riboflavina em uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  utilizando na fase aquosa ( $A_1$ ) água destilada, riboflavina e cloreto de sódio; na fase oleosa diferentes fontes lipídicas como óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de chia e *rendered pork backfat* juntamente com poliglicerol polirricinoleato (PGPR); na fase aquosa externa ( $A_2$ ), água destilada e caseinato de sódio; e como conservante do sistema foi utilizada azida sódica.

### 2.3.1 Técnicas de preparo de emulsões múltiplas

As emulsões múltiplas podem ser produzidas principalmente por dois métodos, a emulsão em única etapa e em duas etapas (PAL, 2007; TADROS, 2009).

Na emulsificação em uma única etapa são utilizadas misturas binárias de tensoativos (álcoois e ésteres graxos etoxilados) que ao serem misturados se distribuem no sistema formando uma emulsão  $A_1/O/A_2$  ou  $O_1/A/O_2$  (PAL, 2007; TADROS, 2009).

A emulsificação em duas etapas é a mais utilizada, onde inicialmente é produzida uma emulsão primária de  $A/O$  ou  $O/A$  que é posteriormente adicionada a outra fase da emulsão aquosa ou oleosa utilizando de tensoativos hidrofílicos e lipofílicos para estabilizar esses sistema múltiplo recém-formado (PAL, 2007; TADROS, 2009).

### 2.3.2 Fatores que interferem na estabilidade das emulsões múltiplas

Durante o armazenamento das emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$  pode ocorrer desestabilização por diversos fenômenos. Segundo Florence e Whitehill (1981) os principais fenômenos são: coalescência dos glóbulos da fase aquosa interna; coalescência dos glóbulos de óleo (independente se esses contêm múltiplos glóbulos ou somente um único glóbulo de  $A_1$ ); ruptura da camada de óleo que separa a fase aquosa interna ( $A_1$ ) da fase aquosa externa ( $A_2$ ) e passagem de água, e outras substâncias, da fase aquosa interna para a externa.

A fim de aumentar a estabilidade das emulsões alguns parâmetros podem ser modulados, a citar, o tipo e a concentração dos tensoativos utilizados nas interfaces, a pressão osmótica entre as fases aquosas, a diferença da capacidade de difusão entre as moléculas dissolvidas nas fase aquosas, a fração volumétrica e o diâmetro médio dos glóbulos aquosos internos e oleosos e a natureza do óleo (HERZI et al., 2014).

#### 2.3.2.1 Influência da presença de tensoativos na interface

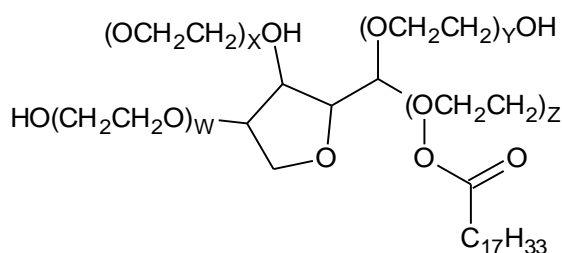
A estabilidade dos filmes interfaciais formados entre os glóbulos da emulsão múltipla é dependente da concentração e do tipo do tensoativo utilizado (HATTREM et al., 2014).

Os tensoativos poliméricos conferem maior estabilidade a emulsão do que os tensoativos de cadeia curta pois apresentam menor mobilidade e são capazes de formar uma camada interfacial mais espessa que pode reduzir a formação de poros transitórios, diminuir a difusão das moléculas e a coalescência dos glóbulos (HATTREM et al., 2014; HERZI et al., 2014). A outra vantagem é a incapacidade de formação de micelas reversas diminuindo a difusão por meio desse mecanismo. (HATTREM et al., 2014).

O Polaxamer<sup>®</sup> 407 é um tensoativo polimérico composto por três cadeias de moléculas, uma cadeia central hidrofóbica de polipropileno e duas cadeias hidrofílicas de polietilenoglicol, possui EHL de 22, sendo classificado como um tensoativo hidrofílico (SCHMIDTS et al., 2009).

O polisorbato 80 é um monooleato de sorbitano polietoxilado (FIGURA 11) e contém em sua estrutura grupos éter e éster possui EHL igual a 15 (SCHMIDTS, et al., 2010a).

FIGURA 9 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO TENSOATIVO POLISORBATO 80



### 2.3.2.2 Influência de componentes osmoticamente ativos

A difusão de moléculas geralmente ocorre devido ao gradiente de concentração entre as fases aquosas, uma das causas desse gradiente é a adição de moléculas a fase aquosa interna para gerar um gradiente osmótico que compense a pressão de Laplace e assim haja um equilíbrio dos potenciais químicos (HERZI et al., 2014). A teoria de Young-Laplace define que a diferença de pressão externa e interna é inversa ao raio do glóbulo, assim glóbulos menores precisarão de uma pressão interna maior para que se mantenham estáveis (TADROS et al., 2004).

O transporte difuso das moléculas entre as fases da emulsão pode ocorrer sem que haja a ruptura dos glóbulos. Entre as formas possíveis de transporte há a solubilização direta na fase oleosa (quando as moléculas são neutras); através de tensoativo hidrofílico (ligação a porção polar do tensoativo, no caso da água); por micelas reversas; e formação de poros transitórios termicamente ativados (HATTREM et al., 2014; HERZI et al., 2014).

### 2.3.2.3 Influência da presença de eletrólitos

As moléculas pequenas, como íons e água, podem sofrer difusão entre a fase aquosa interna ( $A_1$ ) e externa ( $A_2$ ) da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$ . As moléculas de água são difundidas pelos mecanismos de transporte através do tensoativo hidrofílico e micelas reversas, já os íons são transportados por micelas reversas. O

transporte de íons por meio de micelas reversas é dependente da concentração de tensoativo e da camada de óleo ao redor dos glóbulos internos, pois quanto menor a espessura menor a ocorrência de difusão por micelas (CHENG et al., 2007).

A formação das micelas reversas ocorre quando os íons no interior da fase aquosa interna ( $A_1$ ) são solvatados por moléculas de água. Essa hidratação leva a formação de uma “estrutura” que se move até a interface do glóbulo. A fase aquosa interage com a porção polar do tensoativo e esse recobre essa estrutura formando as micelas reversas com a parte apolar exposta. Nessa conformação elas possuem a capacidade de migrar pela camada oleosa até a fase aquosa externa independente da pressão osmótica (CHENG et al., 2007).

#### 2.3.2.4 Influência de aditivos estabilizantes

Os polissacarídeos apresentam grande capacidade de retenção de água e espessamento da fase aquosa, ou seja, aumento da viscosidade da fase externa devido ao seu caráter hidrofílico e elevado peso molecular. Quando utilizados para a estabilização de emulsões eles podem ser classificados em duas categorias: os polissacarídeos capazes de adsorver na superfície do glóbulo da emulsão e os que atuam aumentando a viscosidade da fase externa sem que adsorvam aos glóbulos da emulsão (BOUYER et al., 2012).

Os polissacarídeos adsorventes apresentam atividade interfacial/superficial e atuam estabilizando as emulsões por adsorção na superfície da gota de óleo. Assim, o glóbulo de óleo é praticamente recoberto por um filme de polímero, em seguida eles atuam impedindo a floculação dos glóbulos e coalescência por meio de forças de repulsão estérica e eletrostática. Alguns exemplos de polissacarídeos com esse mecanismo de atuação são goma arábica, amido quimicamente modificado, derivados da celulose, goma guar, sacarina, pectina acetilada de beterraba, entre outros (DICKINSON, 2003).

A grande maioria dos polissacarídeos não apresenta a propriedade de adsorção a interface dos glóbulos da emulsão atuando como agentes espessantes, gelificando a fase externa aquosa ou alterando a viscosidade o que diminui o movimento dos glóbulos e a coalescência (PARASKEVOPOULOU et al., 2005).

A goma xantana é um polissacarídeo aniônico e tem na sua estrutura uma cadeia principal composta por  $\alpha$ -1,4-D-glucose e cadeias laterais a cada dois

resíduos de glucose, essas cadeias laterais são constituídas por  $\alpha$ -D-manose,  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\beta$ -D-manose como resíduo terminal. Os grupos piruvato e acetato também podem ser encontrados em resíduos de manose terminal e não-terminais, respectivamente. A goma xantana é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* e de acordo com as condições de fermentação a que é submetida pode ocorrer variação na quantidade de grupos de acetato e piruvato presentes na estrutura molecular da goma, influenciando assim o peso molecular e a viscosidade (CASAS et al., 2000).

Os alginatos são carboidratos hidrofílicos coloidais extraídos de várias espécies de algas marinhas (Phaeophyceae) especialmente da *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*. A composição química do polímero está diretamente relacionada a sua fonte biológica, crescimento e condições ambientais. A estrutura química do alginato é composta principalmente por  $\alpha$ -(1-4)-L-ácido gulurônico,  $\beta$ -(1-4)-D-ácido manurônico e misturas desses dois ácidos (GACESA,1988 citado por BOUYER et al.,2012). Esse polímero ainda apresenta propriedades coloidais únicas, que incluem espessamento, estabilização, suspensão, formação de filme, produção de gel e estabilização de emulsão (BOUYER et al., 2012).

Assim como a goma xantana e o alginato de sódio, a quitosana é um polissacarídeo de origem natural e é obtida a partir da desacetilação alcalina ou enzimática da quitina que ocorre na cutícula de crustáceos, insetos, moluscos e na parede celular de alguns microrganismos. A estrutura da quitosana é composta por glucosamina e N-acetilglucosamina (CLAESSON; NINHAM, 1992). A quitosana é um polímero catiônico que apresenta a capacidade de estabilização de emulsões por meio da estabilização eletrostática e aumento da viscosidade. A sua capacidade de agente de viscosidade é fortemente influenciado pelo pH da solução, quanto mais ácido o pH maior o aumento de viscosidade, isso ocorre devido a sua estrutura linear não ramificada e seu elevado peso molecular (BOUYER et al., 2012).

#### 2.3.2.5 Influência da proporção de fases

A proporção de fases pode influenciar tanto na obtenção quanto na estabilidade da emulsão múltipla, uma vez que o volume utilizado deve ser compatível com a concentração dos agentes tensoativos e osmóticos, para

estabelecer o equilíbrio no sistema (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012). Quando utilizados volumes elevados de fase aquosa interna ( $A_1$ ) ocorre a diminuição da concentração de óleo utilizado, porém há um aumento na viscosidade que dificulta a segunda etapa de emulsificação (LEAL-CALDERON et al., 2012).

#### 2.3.2.6 Influência da natureza da fase oleosa

A natureza da fase oleosa interfere no desenvolvimento da emulsão múltipla pois afeta a distribuição do tensoativo na interface, o tamanho dos glóbulos e a viscosidade (COLE; WHATELEY, 1995).

Diversos óleos podem ser usados para a composição da fase oleosa da emulsão tanto os de origem mineral como os de origem vegetal (ex. óleo de canola). Quando a fase oleosa é composta por um óleo vegetal de alta viscosidade há aumento na estabilidade, pois esse dificulta a difusão de moléculas entre as fases aquosas e diminui a mobilidade dos glóbulos retardando o processo de coalescência (KUMAR; KUMAR; MAHADEVAN, 2012).

#### 2.3.2.7 Influência da viscosidade

As emulsões apresentam comportamento reológico altamente variável, de modo que sua viscosidade depende fortemente de sua composição, estrutura dos glóbulos e interações interfaciais (MASON, 1999).

A viscosidade de uma emulsão influencia diretamente sua taxa de cremação, sua estabilidade e as propriedades organolépticas, além disso alterações na viscosidade podem indicar o tipo de instabilidade que afeta a emulsão durante o armazenamento (O'REGAN; MULVIHILL, 2010).

A viscosidade pode ser definida como a resistência ao fluxo apresentada por sistemas líquidos e semissólidos. Os fluidos podem ser classificados em Newtonianos e não-Newtonianos. Os fluidos Newtonianos em temperatura constante apresentam viscosidade constante, isso ocorre pois a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional a taxa de deformação aplicada (NETZ; ORTEGA, 2002).

Nos fluidos não-Newtonianos a viscosidade não é constante dependendo de vários fatores, como temperatura, forma de preparo, manuseio, tempo de repouso

entre outros. Os sistemas não-Newtonianos são classificados em três tipos: pseudoplástico, plástico e dilatante (NETZ; ORTEGA, 2002).

Os fluidos que apresentam comportamento pseudoplástico têm a viscosidade variável e essa diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, por outro lado fluidos dilatantes apresentam aumento da viscosidade quando há aumento da taxa de cisalhamento. Nos fluidos com comportamento plástico é necessário que se aplique uma tensão mínima de cisalhamento para que esse comece a fluir, a partir desse valor ele se comporta como um fluido Newtoniano (NETZ; ORTEGA, 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

QUADRO 3 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

(continua)

<b>MATERIAIS E EQUIPAMENTOS</b>	<b>ESPECIFICAÇÃO</b>
Acetato de sódio anidro PA 99%	VETEC
Acetonitrila – grau HPLC	J.T.Baker
Ácido acético	NEON
Ácido fosfórico	NEON
Ácido gálico anidro puríssimo (98%)	VETEC
Ácido sulfúrico	NEON
Agitador de hélice	EEQ 9034 Edutec
Agitador magnético	IKA- RCT Basic
Agitador vórtex	Biomixer QL-901
Água destilada	
Água ultrapura	Purificada por Sistema Milli-Q®
Alginato - protanal LF 20 / 40, com viscosidade de 100 a 200 mPas e alto conteúdo de resíduos G (65 – 75%)	FMC Bio Polymer
Balança	Adventurer TM-OHAVS
Banho termostatizado	EEQ 9074- Edutec
Centrifuga de microtubos	SCIOLOGEX D3024
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> ) puríssimo anidro 96%	VETEC
Cloreto de sódio (NaCl) anidro p.a 99% -	BIOTEC
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse Xdb-C18 (4,6x250mmx5micron)
Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)	Modelo SYS-LC-240-E VARIAN
D(+) glucose anidro P.A	BIOTEC
Espectrofotômetro	Uv-1800 Shimatzu
Espectrofotômetro UV placas	THERMO SCIENTIFIC MULTISCAN FC
Estufa incubadora	Estufa BOD Caltech
Etanol absoluto 99,8%	NEON
Fosfato de sódio monobásico anidro 98%	NEON
Goma xantana	Galena
Medidor de pH – Mpa 210	MS TECNOPON
Metanol – grau HPLC	J.T.Baker
Microscópio ótico	OLYMPUS
Molibdato de amônio 99%	CROMOLINE
Monoleato de sorbitano	Sigma
Óleo de canola	Cargill
Polaxamer®407 - copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno, de fórmula geral $ho(c_2h_4o)_a(c_3h_6o)_b(c_2h_4o)_ah$ , onde $a=101$ e $b=56$ .	Viafarma
Poliglicerol polirricinooleato – emulgel 3207	SAPORITI
Polisorbato 80	NEON
Quitosana	Galena
Reagente Folin-ciocalteau	ALPHATEC
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> ) heptahidratado	BIOTEC
Ultrassom	Ultracleaner 1400 Unique
Viscosímetro	HAAKE Viscotester 6

FONTE: A Autora (2017)

## 3.2 PARÂMETROS CRÍTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO

### 3.2.1 Solubilidade do ácido gálico

#### 3.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorvância máxima ( $\lambda_{max}$ )

A determinação do comprimento de onda de absorvância máxima ( $\lambda_{max}$ ) foi realizada pela análise do perfil de absorvância de soluções padrões  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ácido gálico em água ou etanol anidro.

As varreduras foram feitas em espectrofotômetro UV 1600, Shimadzu®, com intervalo de comprimento de onda entre 200 e 350 nm. Os perfis de absorvância foram visualizados no programa UV-Probe, acoplado ao espectrofotômetro.

#### 3.2.1.2 Solubilidade em água

Foi construída a curva analítica com o ácido gálico solúvel em água nas concentrações 8, 10, 12, 15 e  $17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para a determinação da solubilidade em água foi utilizado um balão de fundo redondo de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de água destilada saturada com ácido gálico. O frasco foi agitado em agitador magnético a temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. A amostra foi então deixada em repouso por 1 hora até equilíbrio e após se procedeu a leitura no espectrofotômetro. O resultado de absorvância foi então comparado com a curva de calibração.

#### 3.2.1.3 Solubilidade em etanol

Foi construída uma curva analítica com o ácido gálico solubilizado em etanol anidro nas concentrações 8, 10, 12, 15 e  $17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para a determinação da solubilidade foi utilizado um balão de fundo redondo de 50 mL. Foram adicionados 20 mL de etanol saturado com ácido gálico. O frasco foi agitado em agitador magnético a temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. A amostra foi então deixada em repouso por 1 hora até equilíbrio e após se procedeu a leitura no espectrofotômetro.

### 3.2.2 Desenvolvimento e validação do método de quantificação do ácido gálico por CLAE-UV

O método utilizado para a quantificação do ácido gálico foi desenvolvido utilizando como base o método de doseamento de compostos fenólicos proposto por Carvalho (2008).

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo SYS-LC-240-E, marca Varian. O cromatógrafo é composto de um computador tipo desktop, software Workstation e dos seguintes módulos:

Photodiode Array Detector modelo 335 série EL06019048 e Solvent Delivery Module modelo 230 série 01513. As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL. A coluna utilizada foi zorbax eclipse xdb-C18 (4,6 x 250mm x 5 micron). O tempo de análise foi de 13 minutos. A proporção de fase móvel e fluxo são descritos na TABELA 1 de acordo com o tempo de eluição.

TABELA 1 - VARIAÇÃO DA FASE MÓVEL NO DECORRER DA ELUIÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	%C
0-10	1,1	88	10	2
10-11	1,2	75	23	2
11-13	1,1	88	10	2
13	1,1	88	10	2

FONTE: A Autora (2016)

NOTA: A= Fase ácida (0,01 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,1 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); B= Metanol e C= Acetonitrila:água (90:10).

A validação analítica tem por objetivo comprovar que o método utilizado para a quantificação de determinado analito é apropriado e apresenta resultado confiável. Assim, os testes realizados foram especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (ANVISA, 2003)

A especificidade foi determinada pela comparação dos cromatogramas da solução de ácido gálico (em fase ácida) com os obtidos quando injetado uma solução contendo os excipientes: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), glucose e sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0 preparada em fase ácida (0,01 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,1 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

A determinação da linearidade foi feita a partir da construção de uma curva analítica com cinco concentrações (48, 54, 60, 66 e 72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Inicialmente foi feita uma diluição com metanol e em seguida as amostras foram diluídas na fase móvel ácida.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando os valores obtidos da avaliação da linearidade, por meio das fórmulas (1) e (2), respectivamente.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (2)$$

Onde:

DPa = Desvio padrão do intercepto das curvas analíticas construídas para a determinação da linearidade

IC=Inclinação da reta obtida na curva de calibração.

A repetibilidade foi determinada por meio da análise de 6 amostras na concentração 100% do teste feitas no mesmo dia. A precisão intermediária foi determinada por meio da análise do desvio padrão relativo (DPR) de 12 amostras, preparadas em 2 dias diferentes, sendo 6 amostras preparadas por dia.

A exatidão foi determinada preparando-se três soluções de ácido gálico nas concentrações de 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida foi adicionado ácido gálico até as concentrações de 48, 60 e 72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foram submetidas ao teste e feita a razão entre o valor experimental encontrado e o valor teórico. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

A robustez foi avaliada variando o fluxo em  $\pm 0,1 \text{ mL.min}^{-1}$  e a porcentagem de fase móvel utilizada durante a eluição.

### 3.2.3 Análise da compatibilidade dos coexcipientes da fase aquosa interna

Foram preparadas soluções de ácido gálico (0,01%), NaCl (0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ), glucose (0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ) em água destilada com pH 6,8. Essas soluções foram armazenadas em frascos de 10 mL com tampa ao abrigo da luz e a temperatura ambiente ( $20 \pm 5$ ) $^\circ\text{C}$ . Do mesmo modo foram preparadas soluções de ácido gálico com o sistema tamponante acetato de sódio

pH 5,0. Foi quantificado por meio de CLAE-UV a quantidade de ácido gálico remanescente no 1º, 7º e 14º dia após o preparo (Adaptado de Aditya et al., 2015a)

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO PRIMÁRIA

#### 3.3.1 Análise da estabilidade preliminar e microscopia

As emulsões foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente após 24 horas da manipulação. As amostras foram analisadas com relação a separação de fases e aspecto da emulsão, sendo classificadas como normal, cremeação e separação de fases .

#### 3.3.2 Seleção do tensoativo lipofílico

Inicialmente foi preparada uma emulsão primária (A<sub>1</sub>/O) composta por uma fase aquosa com água destilada (6,2 g), ácido gálico (0,06 g) e por uma fase oleosa com óleo de canola (17,5 g) e poliglicerol polirricinoleato (1,25 g). As fases foram aquecidas a 60°C em banho-termostatizado sob leve agitação manual. Após, foram retiradas do aquecimento e a fase aquosa foi acrescentada sobre a fase oleosa sob agitação magnética a 2000 rpm durante 5 minutos, de acordo com metodologia adaptada de Aditya et al. (2015), sendo essa denominada de AmP5. As demais variações propostas foram em relação a composição do sistema tensoativo e a proporção dos tensoativos, sendo as composições expostas na TABELA 2.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO TENSOATIVO LIPOFÍLICO PARA A EMULSÃO MÚLTIPLA

		AmP5		AmP6		AmPS5		AmPS6		AmS5		AmS6	
		g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
Fase Aquosa	Ácido gálico	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25
	Água destilada	6,1875	24,75	6,1875	24,75	6,1875	24,75	6,1875	24,75	6,1875	24,75	6,1875	24,75
Fase Oleosa	Óleo de canola	17,5	70	17,25	69	17,5	70	17,25	69	17,5	70	17,25	69
	PGPR	1,25	5	1,5	6	0,625	2,5	0,75	3				
	Monooleato de sorbitano					0,625	2,5	0,75	3	1,25	5	1,5	6
	EHL	1,5		1,5		2,9		2,9		4,3		4,3	

FONTE: A Autora (2016)

NOTA: PGPR: poliglicerol polirricinoleato Am= amostra; P5: 5% de PGPR; P6:6% de PGPR; PS5: 2,5% de PGPR e 2,5% de monooleato de sorbitano; PS6: 3% de PGPR e 3% de monooleato de sorbitano; S5= 5% de monooleato de sorbitano; S6%= 6% de monooleato de sorbitano.

### 3.3.3 Seleção do sistema tamponante

Os sistemas tamponantes selecionados inicialmente foram pH 3,0; 5,0 e 7,0 preparados segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010). O sistema tamponante acetato pH 3,0 foi preparado utilizando 12 g de acetato de sódio, 6 mL de ácido acético e água destilada, o volume foi ajustado até 100 mL. O sistema tamponante acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,0 foi preparado adicionando 13,61g de acetato de sódio trihidratado e 1000 mL de água destilada, o pH foi ajustado com o auxílio de uma solução de ácido acético 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O sistema tamponante acetato pH 7,0 foi preparado adicionando 2,73 g de acetato de sódio em aproximadamente 70 mL de água, em seguida foi ajustado o pH 7,0 com ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, o volume foi então completado para 100 mL de água

A emulsão primária A<sub>1</sub>/O foi preparada como descrito no item 3.4.2, utilizando a composição de formulação apresentada na TABELA 3.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO SISTEMA TAMPONANTE PARA A FASE AQUOSA INTERNA DA EMULSÃO MÚLTIPLA

	Massa (g)	Porcentagem (%)
Ácido gálico	0,0625	0,25
Sistema tamponante (3,0; 5,0; ou 7,0)	6,1875	24,75
Óleo de canola	17,25	69
PGPR (Poliglicerol polirricinoleato)	1,5	6

FONTE: A Autora (2016)

### 3.3.4 Seleção do eletrólito para a fase aquosa interna

O preparo da emulsão primária foi executado como no item 3.4.2 utilizando como fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) o ácido gálico dissolvido no sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0. A composição da formulação está apresentada na TABELA 4.

Os eletrólitos foram acrescentados separadamente a fase aquosa interna (A<sub>1</sub>) da emulsão primária, na concentração de 0,100 mol.L<sup>-1</sup>. Os eletrólitos selecionados para o estudo foram cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e glucose. O volume utilizado de sistema tamponante acetato de

sódio pH 5,0 foi modificado para que a proporção entre a fase aquosa e oleosa (25:75) não fosse alterada (Adaptado de SCHMIDTS et al., 2010).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES PARA SELEÇÃO DO ELETRÓLITO PARA A FASE AQUOSA INTERNA DA EMULSÃO MÚLTIPLA

Componentes/ Amostra	AmNaCl (g)	AmCaCl <sub>2</sub> (g)	AmMgSO <sub>4</sub> (g)	AmGlucose (g)
Ácido gálico	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
Sistema tamponante 5,0	6,0414	5,9109	5,8875	5,7375
Eletrólito	0,1461	0,2766	0,30	0,45
Óleo de Canola	17,25	17,25	17,25	17,25
PGPR	1,5	1,5	1,5	1,5

FONTE: A Autora (2016)

NOTA: AmNaCl: amostra contendo como eletrólito o NaCl; AmCaCl<sub>2</sub>: amostra contendo como eletrólito o CaCl<sub>2</sub>; AmMgSO<sub>4</sub>: amostra contendo como eletrólito o MgSO<sub>4</sub>; AmGlucose: amostra contendo como eletrólito o glucose; PGPR (Poliglicerol polirricinoleato).

### 3.4 PREPARO DA EMULSÃO MÚLTIPLA

#### 3.4.1 Análise de estabilidade preliminar e microscopia

As emulsões foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente após 24 horas da manipulação. As amostras foram analisadas em relação a separação de fases e aspecto da emulsão, sendo classificadas como normal, cremeação e separação de fases.

#### 3.4.2 Seleção do tensoativo para a segunda etapa de emulsificação e determinação do valor mais adequado de EHL e proporção de emulsão primária e fase aquosa externa

A emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> foi preparada em duas etapas. Inicialmente foi preparada a emulsão primária (A<sub>1</sub>/O) como descrito no item 3.4.2. Na segunda etapa foi adicionada a fase aquosa externa com o tensoativo polisorbato 80 (EHL=15) ou Polaxamer 407<sup>®</sup> (EHL=22) sobre a emulsão primária A<sub>1</sub>/O na proporção 1:1 sob agitação magnética de 2000 rpm durante 5 minutos.

As concentrações de tensoativo e determinação do EHL foram estabelecidas através do cálculo do EHL (3) para emulsões múltiplas proposto por Frenkel et al. (1983).

$$EHL = \frac{EHL(I) \times \phi(A/O)/A \times wt\%(I) + EHL(II) \times wt\%(II)}{\phi(A/O)/A \times wt\%(I) + wt\%(II)} \quad (3)$$

Onde:

EHL(I) = valor do EHL do tensoativo utilizado na emulsão primária A<sub>1</sub>/O;

$\phi(A/O)/A$  = fração da emulsão A<sub>1</sub>/O na emulsão múltipla;

wt%(I) = porcentagem do tensoativo I na emulsão A<sub>1</sub>/O;

EHL(II) = valor do EHL dos tensoativos na fase A<sub>2</sub>;

wt%(II) = porcentagem dos tensoativos II na emulsão múltipla.

Fonte: Adaptado de Frenkel et al. (1983).

### 3.4.3 Seleção do polissacarídeo na fase aquosa externa da emulsão

Foram adicionados os polímeros alginato de sódio, quitosana e goma xantana nas concentrações 0,25%, 0,25% e 0,08%, respectivamente

### 3.4.4 Influência da temperatura e ordem de adição da emulsão primária a fase aquosa externa

A emulsão múltipla (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) contendo o ácido gálico foi preparada com ausência de aquecimento ao longo do processo sendo a fase aquosa externa (A<sub>2</sub>) adicionada a emulsão primária e agitada a 2000 rpm a temperatura ambiente. Após foi analisada macroscopicamente quanto a estabilidade preliminar.

A emulsão múltipla foi também preparada utilizando aquecimento das fases durante o processo, sendo a fase aquosa e emulsão primária aquecidas separadamente até a temperatura de 60°C. A fase aquosa externa foi vertida sobre a emulsão primária e agitada por 5 minutos a temperatura ambiente.

Os testes para a seleção da ordem de adição das fases no sistema múltiplo emulsionado (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>), na segunda etapa de emulsificação foram realizados modificando a etapa na qual se verte a fase aquosa externa sobre a emulsão primária. Sendo que em uma amostra foi vertida a emulsão primária sobre a fase aquosa e na amostra seguinte verteu-se a fase aquosa sobre a emulsão primária.

### 3.5 ANÁLISE DA EMULSÃO MÚLTIPLA (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) CONTENDO ÁCIDO GÁLICO

#### 3.5.1 Determinação da viscosidade

A viscosidade foi determinada com o auxílio do equipamento HAAKE Viscotester 6L/R plus. Utilizando o spin L3.

#### 3.5.2 Teste de estabilidade

As amostras foram submetidas a temperatura de 20°C por um período de 28 dias. As análises foram realizadas no 1º, 7º, 14º e 28º dia após o preparo. As amostras foram avaliadas quanto as possíveis variações nos valores de pH, estabilidade cinética, fenóis totais e teste para verificar a capacidade antioxidante (redução do complexo de fosfomolibdênio).

##### 3.5.2.1 Determinação do valor de pH

O valor de pH foi determinado por meio da inserção do eletrodo do potenciômetro diretamente na amostra. O potenciômetro foi previamente calibrado com os sistemas tamponantes pH 4,0 e 7,0. As análises foram executadas em triplicata.

##### 3.5.2.2 Estabilidade cinética

Foram transferidos 10 mL das emulsões para tubos cilíndricos (1 cm de diâmetro e 12 cm de altura) e armazenadas durante 28 dias a 25°C. A altura inicial da emulsão (AE), altura da camada de sedimentação (AS) e altura da camada superior de cremação (AC) foram determinadas. O índice de estabilidade da emulsão (IEE) foi calculado por meio da fórmula (4) (ABDOLMALEKI et al., 2016; GOMES et al., 2016). As análises foram executadas em triplicata.

$$IEE\% = (AE - AS) \times \frac{100}{AE} \quad (4)$$

### 3.5.2.3 Determinação de fenóis totais

Para a determinação de fenóis totais foi utilizado o método descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010) sendo adicionado 800 µL de amostra ou branco (água destilada), 4 mL de água destilada, 400 µL do reagente Folin-Ciocalteu em balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com solução de carbonato de sódio 29%. A reação foi incubada ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30 minutos e após, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro de ultravioleta no comprimento de 760 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva de calibração do ácido gálico nas concentrações 10; 25, 50, 75 e 90 µg/mL. Para o preparo da amostra foi feita uma recuperação do ácido gálico, na qual inicialmente foi adicionado 500 mg de emulsão múltipla (A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) a 500µL de metanol, após foi agitado por 2 minutos em vórtex e centrifugado a 15000 xg em centrífuga para microtubos e foi preparada uma solução adicionando o sobrenadante a balões de 10 mL e completado o volume. As análises foram executadas em triplicata.

### 3.5.2.4 Determinação da atividade antioxidante por redução do complexo de fosfomolibdênio

Foi adicionado em tubo de ensaio 0,3 mL de amostra, branco ou padrão e 3 mL de solução reagente complexo fosfomolibdênio (ácido sulfúrico 0,6 mol.L<sup>-1</sup>, 28 mmol.L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio e 4 mmol.L<sup>-1</sup> molibdato de amônio). Os tubos foram incubados em banho-termostatizado a 95°C por 90 minutos. Após atingir a temperatura ambiente se procedeu a leitura em espectrofotômetro a 695 nm. Foi utilizado como padrão uma solução de ácido gálico (62,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e como branco água destilada (PRIETO et al., 1999). O preparo da amostra foi executado de acordo com o item 3.6.2.3.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

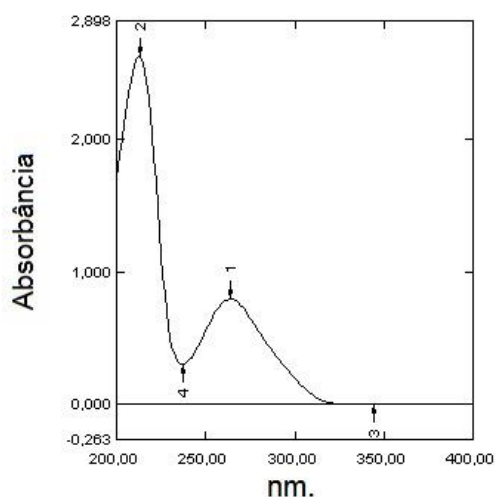
### 4.1 PARÂMETROS CRÍTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO

#### 4.1.1 Solubilidade do ácido gálico

##### 4.1.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda_{max}$ )

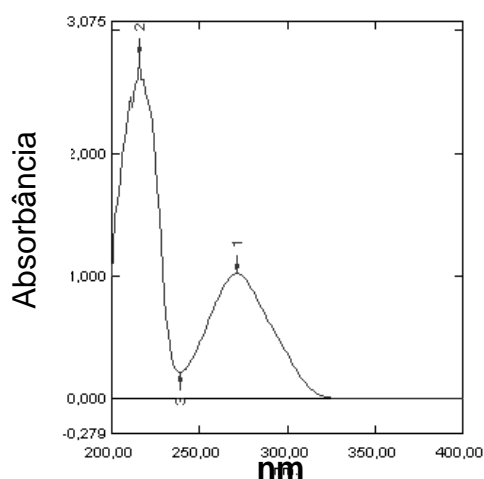
O espectro foi obtido na faixa de 200 nm a 350 nm para a água e para o etanol anidro demonstrando que os comprimentos de onda nos quais ocorreram a maior absorção foi 264 nm e 273 nm, respectivamente (GRÁFICOS 1 e 2).

GRÁFICO 1 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO ÁCIDO GÁLICO EM água, NA FAIXA DE 200 NM A 350 NM



FONTE: A Autora (2016)

GRÁFICO 2 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL ANIDRO, NA FAIXA DE 200 NM A 350 NM

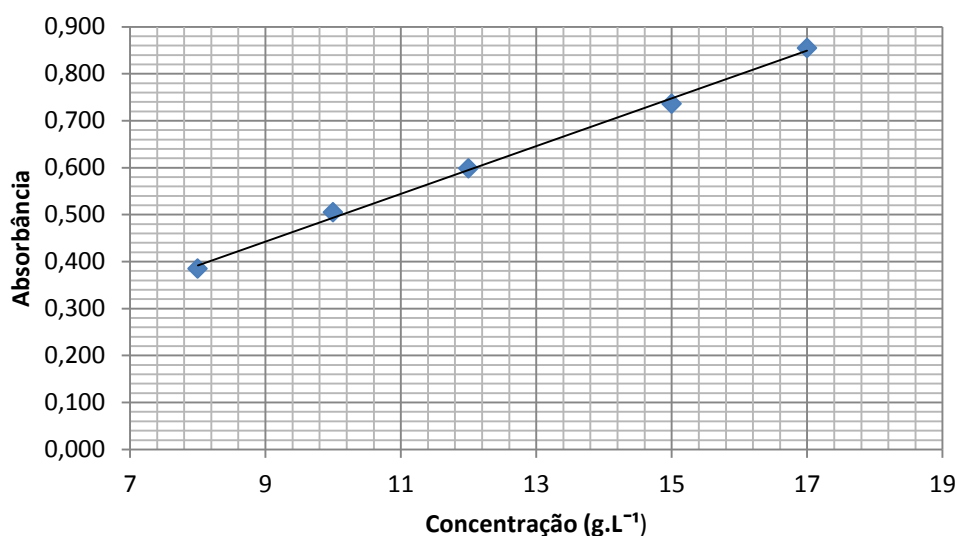


FONTE: A Autora (2016)

#### 4.1.1.2 Solubilidade em água

A curva de calibração (GRÁFICO 3) foi construída no comprimento de onda máximo. A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0,9975 para a curva da água, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta  $y = 0,0508x - 0,0139$ .

GRÁFICO 3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM ÁGUA NO  $\lambda=264$  nm



FONTE: A autora (2016)

Os valores encontrados de solubilidade do ácido gálico em água, presentes na TABELA 5 são compatíveis com os presentes na literatura apresentados no QUADRO 2, os quais variam em um intervalo de 1,00 a 1,516 g/100mL. Desse modo após a determinação da solubilidade é possível a utilização destes valores para o desenvolvimento da forma farmacêutica proposta.

TABELA 5 - VALORES DE SOLUBILIDADE PARA O ÁCIDO GÁLICO EM ÁGUA

Amostras	Absorbância 264nm	FCD	g/mL	g/100mL	Média (±DP)	DPR%
Amostra 1	0,607	1	0,0136	1,356	1,388 (±0,032)	2,358
Amostra 2	0,622		0,0139	1,389		
Amostra 3	0,637		0,0142	1,421		

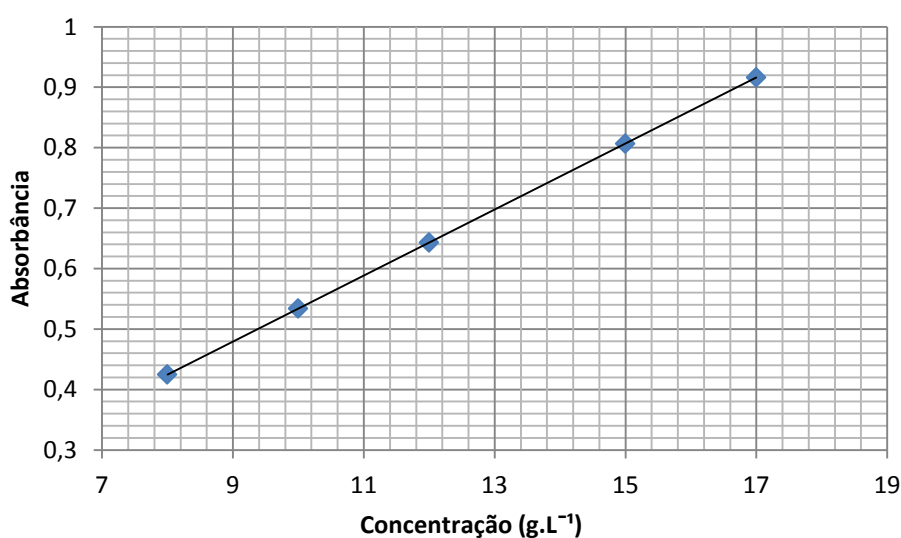
FONTE: A Autora (2016)

NOTA: Fcd:= Fator de correção da diluição; DP: Desvio Padrão; DPR%= desvio padrão relativo em porcentagem

#### 4.1.1.3 Solubilidade em etanol

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados para a curva do etanol apresentou um coeficiente de correlação de 0,9995 indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta  $y = 0,0546x - 0,012$ . A curva de calibração é apresentada no GRÁFICO 4.

GRÁFICO 4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL NO  $\lambda = 273 \text{ nm}$



FONTE: A Autora (2016)

TABELA 6 - VALORES DE SOLUBILIDADE PARA O ÁCIDO GÁLICO EM ETANOL

Amostras	Absorbância 273nm	FCD	g/mL	g/100mL	Média ( $\pm$ DP)	DPR%
Amostra 1	0,374	0,025	0,177	17,67	17,72 ( $\pm$ 0,48)	2,72
Amostra 2	0,386		0,182	18,22		
Amostra 3	0,365		0,173	17,26		

FONTE: A Autora (2016)

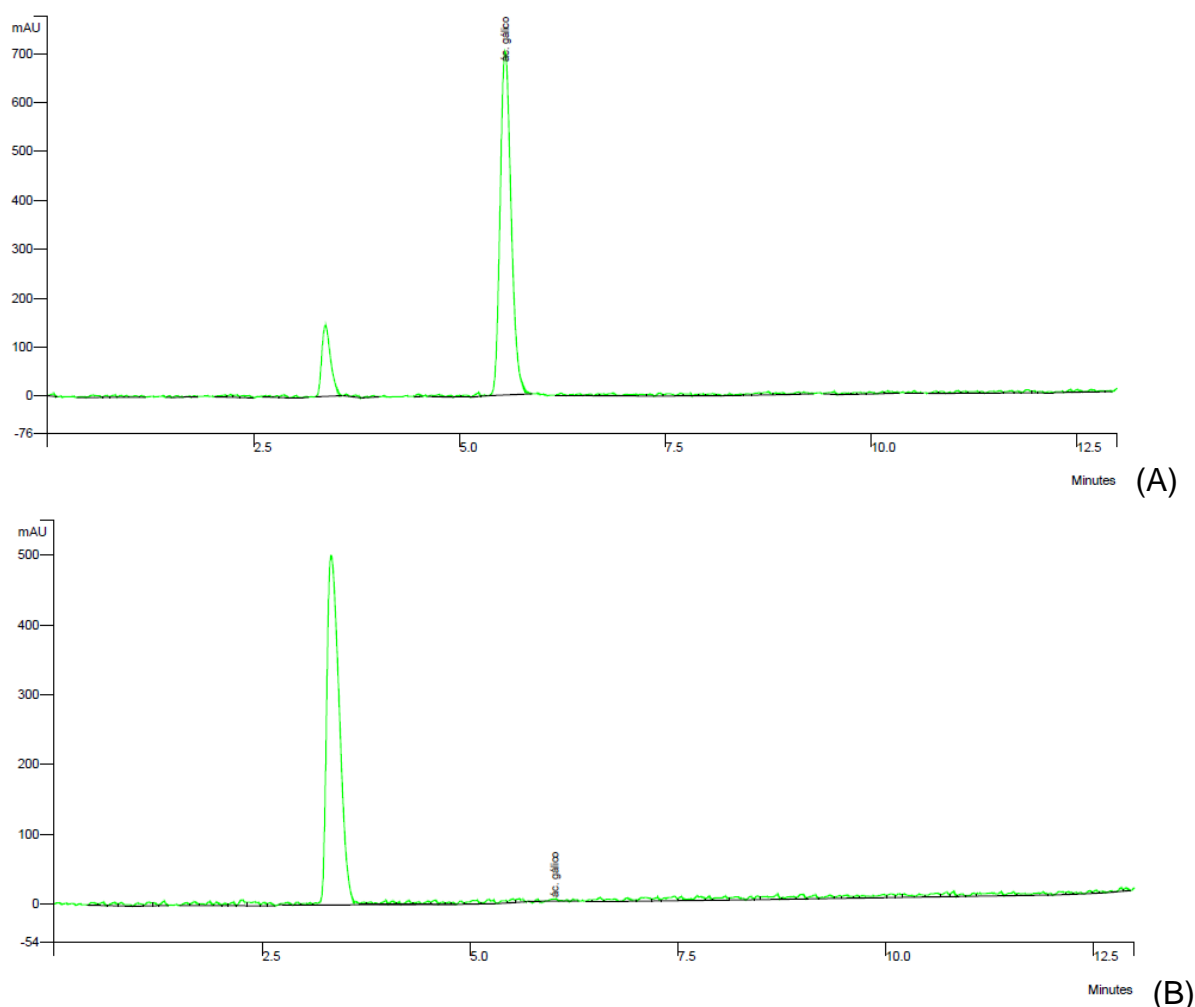
NOTA: FCD: Fator de correção da diluição; DP: Desvio Padrão; DPR%= desvio padrão relativo em porcentagem

Os valores encontrados de solubilidade do ácido gálico em etanol anidro, presentes na TABELA 6 ficaram abaixo dos valores encontrados na literatura apresentados no QUADRO 2, os quais variam em um intervalo de 18,90 ( $\pm$ 0,22) g/100mL.

#### 4.1.2 Validação analítica do método de quantificação por CLAE-UV

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas da solução contendo ácido gálico e da solução contendo os sais com o objetivo de confirmar que a presença dos coexcipientes não interferiam no tempo de retenção e na quantificação do ácido gálico. Os resultados obtidos demonstram que a presença dos sais não interfere na quantificação do ácido gálico, confirmando a especificidade do método proposto (FIGURA 9).

FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS ( $\lambda=215$  nm) OBTIDOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV



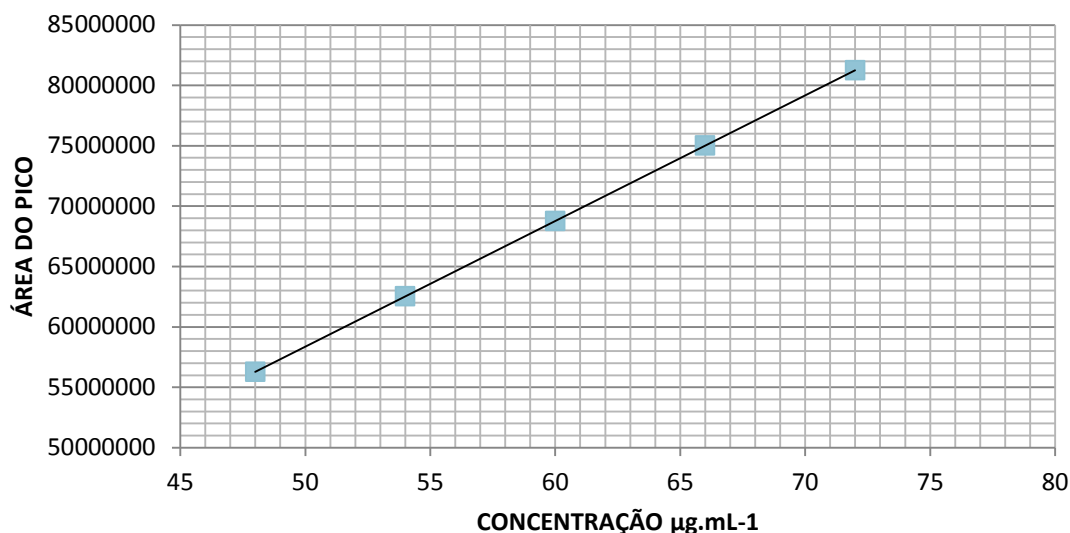
FONTE: A autora (2016)

NOTA: (A) SOLUÇÕES DE COEXCIPIENTES E ÁCIDO GÁLICO  
(B) SOLUÇÃO DE COEXCIPIENTES

A curva analítica média para a quantificação do ácido gálico apresentou a equação da reta obtida pelo método de mínimos quadrados

$y = 1040420x + 6328840$ , onde  $y$  é a área do pico e  $x$  é a concentração da solução padrão em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O coeficiente de correlação foi igual a 0,9988 indicando uma regressão linear significativa (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 - Curva analítica padrão para a determinação do ácido gálico obtida por CLAE-UV ( $\lambda=215$  nm) na faixa de concentração de 48 a 72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$



FONTE: A Autora (2016)

NOTA: O teste foi executado em triplicata

Os valores obtidos foram  $7,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o limite de detecção e  $24,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o limite de quantificação. Estes resultados indicam que a quantificação pelo método cromatográfico escolhido é adequado para detectar e quantificar o ácido gálico na faixa de concentração entre 48 a 72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Na TABELA 7 estão expressos os resultados da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária, em desvio padrão relativo (DPR). Para ambos os estudos, os valores de DPR foram inferiores a 5%, demonstrando que o método analítico apresenta repetibilidade e precisão intermediária adequada para a quantificação do ácido gálico.

TABELA 7 - RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS PARA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-UV

Parâmetro analisado		Especificação	Quantificação ácido gálico	
Especificidade	Influência dos excipientes	Os excipientes não podem interferir no doseamento do ácido gálico	Conforme	
	Pureza do pico	Mínimo 99%	99,99%(tr =6,02)	
	Correlação com o pico padrão	Mínimo 95%	99,99% (tr = 5,58)	
Linearidade	Curva	$R^2 \geq 0,99$	$R^2=0,9988$	
Precisão	Repetibilidade (n=6)	DPR $\leq 5\%$	4,41%	
	Intermediária (n=12)	DPR $\leq 5\%$	4,74%	
Exatidão	Adição de padrões	Recuperação 95 a 105%	Conc. 80%	104,29%
			Conc. 100%	96,72%
			Conc. 120%	99,96%
Robustez	Fluxo	DPR $\leq 5\%$	1 mL	0,89%
		DPR $\leq 5\%$	1,2 mL	4,54%
	Proporção da fase móvel	DPR $\leq 5\%$	T=1-10min A%=89 B%=9 C%=2	2,00%
		DPR $\leq 5\%$	T=1-10min A%=87 B%=11 C%=2	1,78%

Fonte: A Autora (2016)

NOTA: tr = tempo de retenção;  $R^2$  = coeficiente de regressão linear; DPR = Desvio padrão relativo; n = número de amostras; Conc. = Concentração com relação a curva de calibração; t = tempo de eluição; A = Fase ácida (0,01 mol. L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,1 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); B = metanol e C = Acetonitrila: água (90:10).

Os resultados de exatidão obtidos apresentaram uma porcentagem de recuperação dentro dos valores esperados como demonstrado na TABELA 7, sendo assim o método é considerado exato.

Para a análise de robustez foram feitas variações no fluxo e na proporção da fase móvel, o método apresentou DPR < 5%, podendo ser considerado robusto para as condições testadas (TABELA 7).

#### 4.1.3 Análise da compatibilidade dos coexcipientes da fase aquosa interna

Foram realizados testes de quantificação do ácido gálico com soluções aquosas contendo somente o ácido gálico, eletrólitos e sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0 com o objetivo de determinar a estabilidade do ácido gálico com os coexcipientes utilizados para o desenvolvimento da emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>. Os resultados dessa análise são expostos na TABELA 8.

TABELA 8 - PORCENTAGEM DE ÁCIDO GÁLICO REMANESCENTE NO TESTE COM OS EXCIPIENTES APÓS O ARMAZENAMENTO PELO PERÍODO DE 7 E 14 DIAS A TEMPERATURA AMBIENTE ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ; pH 6,8)

Excipientes	% ácido gálico remanescente durante o armazenamento	
	7 dias	14 dias
Ácido gálico	$99,66 \pm 2,31$	$98,25 \pm 2,19$
Ácido gálico + NaCl	$96,06 \pm 6,71$	$92,17 \pm 2,69$
Ácido gálico + $\text{CaCl}_2$	$99,98 \pm 1,68$	$97,47 \pm 1,98$
Ácido gálico + $\text{MgSO}_4$	$95,44 \pm 7,68$	$95,37 \pm 2,61$
Ácido gálico + Glucose	$98,10 \pm 1,39$	$98,10 \pm 1,62$
Ácido gálico + sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0	$100 \pm 6,79$	$100,25 \pm 6,92$

FONTE: A Autora (2016)

NOTA: As concentrações iniciais de ácido gálico (0,01%), NaCl (0,1 mol.L<sup>-1</sup>),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mol.L<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4$  (0,1 mol.L<sup>-1</sup>), glucose (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) e sistema sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0.

A análise das soluções de ácido gálico com os excipientes demonstrou não haver diferença significativa entre o decaimento da concentração do ácido gálico em contato com diferentes sais, ou somente em solução aquosa. Esses resultados permitem a utilização dos excipientes testados na formulação, uma vez que não interferem diretamente na estabilidade do ácido gálico em fase aquosa.

## 4.2 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO PRIMÁRIA

### 4.2.1 Seleção do tensoativo lipofílico

Os tensoativos utilizados no preparo das emulsões para a seleção do mais adequado para a emulsão primária foram o monooleato de sorbitano e o poliglicerol polirricinoleato (PGPR), uma vez que Schmidts et al. (2010) recomenda a utilização de tensoativos lipofílicos de baixo peso molecular para emulsões A<sub>1</sub>/O.

Os tensoativos PGPR e monooleato de sorbitano são solúveis em óleos vegetais e minerais e insolúveis em água (USHIKUBO; CUNHA, 2014), observando essa propriedade físico-química optou-se por adicionar esses tensoativos na fase oleosa, ou seja no óleo de canola.

As formulações que possuíam PGPR ou a mistura (PGPR e monooleato de sorbitano) continuaram estáveis após 24 horas. Para as formulações AmS5 e AmS6, que possuíam como tensoativo apenas o monooleato de sorbitano, não ocorreu a formação da emulsão.

Assim, as amostras analisadas e acompanhadas foram AmP5, AmP6, AmPS5 e AmPS6, a composição das amostras está descrita na TABELA 2 presente no item 3.4.2 .

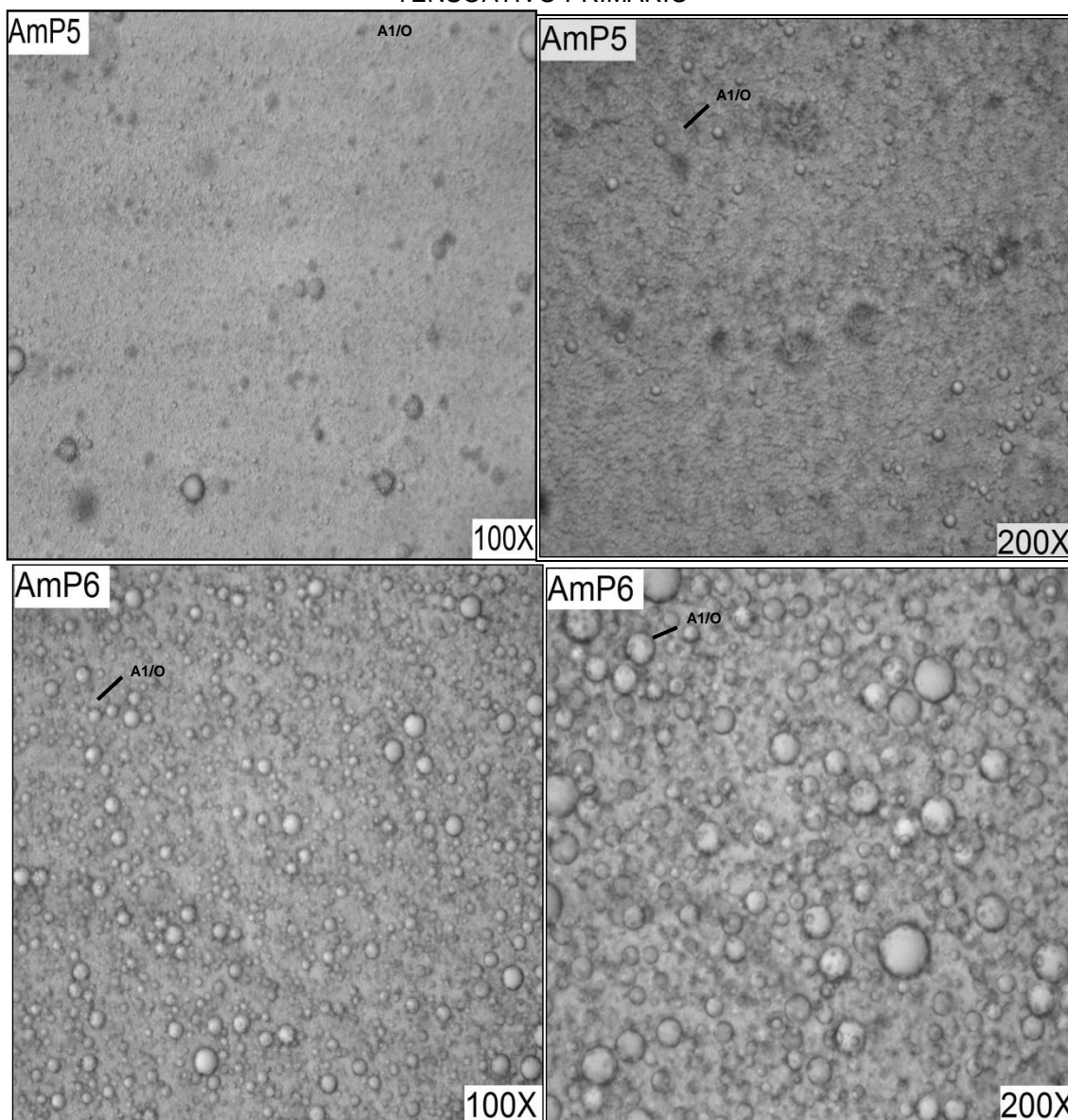
As amostras AmPS5 e AmPS6 apresentaram EHL de 2,9, calculado com o auxílio da equação proposta por Griffin (1949) com aspecto homogêneo e sem separação de fases após 48 horas. As amostras AmP5 e AmP6 apresentaram aspecto homogêneo e pequenos glóbulos de água dispersos homogeneamente na fase oleosa. Após 48 horas as amostras não apresentaram separação de fases.

A estabilidade das amostras está diretamente relacionada com o tamanho dos glóbulos da fase aquosa interna, como demonstrado na FIGURA 10. Ocorreu a formação de pequenos glóbulos de água no interior da emulsão primária ( $A_1/O$ ) o que resulta em maior estabilidade do sistema, pois estas apresentam menor velocidade de sedimentação, pela atuação da força gravitacional conforme descrito pela Lei de Stokes (USHIKUBO; CUNHA, 2014; SCHMIDTS et al., 2010).

A homogeneidade da amostra e a uniformidade do tamanho das partículas é objetivado no desenvolvimento de emulsões, pois quando estas características estão presentes há uma diminuição da ocorrência de coalescência dos glóbulos, fenômeno que quando ocorre resulta na maturação de Ostwald (SCHMIDTS et al., 2010).

As cadeias hidrofóbicas do PGPR interagem com as estruturas do ácido oléico e esteárico presentes no óleo de canola (ESLAMI et al., 2017), resultando em uma boa elasticidade da interface. Além disso, a porção hidrofílica, constituída de cadeias de poliglicerol, com grupamentos hidroxila, interagem com as moléculas de água por ligações de hidrogênio , contribuindo assim para uma interface estruturada. A disposição do PGPR na interface da emulsão confere uma característica viscoelástica à camada interfacial o que diminui a coalescência dos glóbulos (USHIKUBO; CUNHA, 2014).

FIGURA 11 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO PRIMÁRIA A<sub>1</sub>/O PARA A SELEÇÃO DO TENSOATIVO PRIMÁRIO



FONTE: A Autora (2016)

Considerando que o aumento da concentração de tensoativo lipofílico pode interferir diminuindo a troca de moléculas de água, bem como no transporte de íons entre as fases aquosas (SCHMIDTS et al., 2010), a quantidade de PGPR selecionado foi 6% em massa.

#### 4.2.2 Seleção do sistema tamponante

Um sistema tamponante é um sistema aquoso que resiste a variações de pH e é composto por um par ácido-base conjugado, assim quando adicionada uma

pequena quantidade de ácido ou base à solução, há um aumento ou diminuição da concentração dos componentes do sistema tamponante para restaurar o equilíbrio e permanecer na faixa de tamponamento (NELSON ; COX , 2011).

A adição de um sistema tamponante teve como objetivo estabilizar o pH da emulsão, levando em consideração o pH no qual o ácido gálico apresentasse forte atividade antioxidante sem prejudicar a estabilidade da formulação. Todas as formulações (pH 3,0; 5,0 e 7,0) apresentaram separação de fases, após 24 horas.

A formulação com o sistema tamponante pH 7,0 apresentou menor separação de fases, porém em elevados valores de pH o ácido gálico é instável, pois é rapidamente oxidado pelo oxigênio atmosférico (FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000).

O ácido gálico apresenta aumento na sensibilidade ao oxigênio, proporcionalmente ao aumento de valores de pH. Em valores de  $\text{pH} < 6,0$  o consumo de ácido gálico devido a oxidação não é significativo (STRLIC et al., 2002).

O valor de pH no qual o ativo estava mais estável e a formulação se apresentava promissora com relação a estabilidade foi o sistema tamponante pH 5,0 uma vez que os valores de  $\text{pKa}$  do ácido gálico são 4,0; 8,7; 11,4 e  $> 13$  (SŁAWINSKA et al., 2007; ESLAMI et al., 2010).

#### 4.2.3 Seleção do eletrólito para a fase aquosa interna

Ocorreu separação de fases nas emulsões contendo os eletrólitos  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  e glucose. Na emulsão com  $\text{NaCl}$  a separação de fases foi menos evidente sendo esta emulsão selecionada para continuar os estudos de desenvolvimento da emulsão múltipla.

Na emulsão com  $\text{CaCl}_2$  após 7 dias, parte da emulsão ficou escura indicando possível maior oxidação do ácido gálico, enquanto que as demais não apresentaram as manchas escuras.

A presença de eletrólitos em emulsões  $\text{A}_1/\text{O}$  é capaz de aumentar a densidade de adsorção do tensoativo na interface da emulsão e alterar a tensão interfacial (ARONSON; PETKO, 1993; PAWLIK et al., 2010). Alguns sais inorgânicos, como o cloreto de sódio, alteram o mecanismo pelo qual as moléculas de surfactante se orientam na interface o que fortalece as interações entre elas que

resulta em aumento da viscosidade interfacial e da elasticidade e assim promove a estabilidade dos glóbulos (PAWLIK et al., 2010).

A concentração de sais na fase aquosa interna das emulsões deve ser suficientemente alta para compensar a pressão de Laplace, a qual os glóbulos estão sujeitos devido ao seu pequeno tamanho. Mas, por outro lado deve ser suficientemente baixa para inibir o inchaço osmótico dos glóbulos (SCHMIDTS, et al., 2010).

Kawashima et al. (1992), fazendo uma análise sobre a composição da fase aquosa interna hipertônica e hipotônica, concluíram que emulsões hipertônicas eram mais estáveis devido a um aumento de viscosidade. Em 2004, Mezzenga e colaboradores afirmaram que ocorre uma força termodinâmica motora que ocasiona a movimentação de gotículas de água da fase externa para a fase interna quando a concentração de soluto da fase interna é maior que da fase externa. Assim, o volume ocupado pelos glóbulos de água dentro dos glóbulos de óleo pode ser aumentado ou diminuindo alterando a pressão osmótica entre a fase aquosa interna ( $A_1$ ) e externa ( $A_2$ ), como comprovado em estudo realizado por Iqbal et al. (2013) no qual também observaram o aumento de viscosidade das emulsões múltiplas quando comparadas a emulsões primária.

Sapei et al. (2012), em estudo realizado para análise de estabilidade utilizando diferentes quantidades de NaCl na fase aquosa interna ( $A_1$ ), observaram a migração de água da fase aquosa externa ( $A_2$ ) para a fase aquosa interna ( $A_1$ ) devido ao gradiente osmótico. O gradiente utilizado foi ~685 a 2735 mOsm para a incorporação de 2-8% (m/m) de NaCl. Essas emulsões apresentaram boa estabilidade não ocorrendo quebra dos glóbulos de óleo ou ainda separação de fases o que indica que o PGPR fornece ao filme interfacial a capacidade de se expandir e comprimir adequando-se ao tamanho do glóbulo de água interno, apesar da migração de água entre as fases aquosas (SAPEI et al., 2012).

Em estudos realizados por Sapei et al. (2012) houve um efeito sinérgico entre o NaCl e PGPR em emulsões  $A_1/O$  com a fase oleosa contendo óleo de canola ocorrendo notável sedimentação e estabilidade de tamanho de partícula. Em estudo realizado por Pawlik et al. (2010) foi comprovado que a presença de NaCl aumentou a estabilidade das emulsões diminuindo a ocorrência de coalescência e separação de fases.

O eletrólito selecionado para a formulação da emulsão múltipla foi o cloreto de sódio, levando em consideração a estabilidade da emulsão múltipla e do ácido gálico, o que ocorre provavelmente devido a interação entre o NaCl e o PGPR e a compensação da pressão de LaPlace pela presença de um agente osmoticamente ativo.

### 4.3 PREPARO DA EMULSÃO MÚLTIPLA

#### 4.3.1 Seleção do tensoativo hidrofílico para a segunda etapa de emulsificação e determinação do valor mais adequado de EHL e proporção de emulsão primária e fase aquosa externa

Para a segunda etapa de emulsificação foram selecionados dois tensoativos com alto valor de EHL, ou seja, tensoativos hidrofílicos, tornando possível a formação de uma emulsão óleo em água, onde na fase oleosa estariam dispersas os glóbulos de água resultando na formação da emulsão múltipla água-em-óleo-em-água( $A_1/O/A_2$ ).

Os tensoativos selecionados para o estudo de seleção do tensoativo para a segunda etapa de emulsificação foram o Polaxamer 407<sup>®</sup> e o polisorbato 80.

Para o tensoativo Polaxamer 407<sup>®</sup> na proporção de 3,5%, não ocorreu a formação da emulsão múltipla.

Quando utilizado 3,5% de polisorbato 80 ocorreu a formação dos glóbulos de emulsão múltipla sendo esse tensoativo escolhido para a próxima etapa de seleção da proporção de fases na emulsão e quantidade de tensoativo.

A seleção da quantidade adequada de tensoativo, bem como a prevenção de interações negativas entre os tensoativos da interface  $A_1/O$  e  $O/A_2$  são parâmetros importantes para a estabilidade da emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$ . A utilização de tensoativos de baixo peso molecular para a interface  $A_1/O$  e tensoativo de elevado peso molecular ou polimérico na interface  $O/A_2$  conferem uma boa estabilidade para a emulsão múltipla (SCHMIDTS et al., 2010).

A TABELA 9 apresenta as concentrações de tensoativo utilizado e os valores de EHL obtidos utilizando a equação proposta por Frenkel et al. (1983) e a TABELA 10 apresenta a composição utilizada para os testes das proporções de fases e concentração de tensoativo polisorbato 80.

TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO E VALOR CALCULADO DE EHL NAS FORMULAÇÕES DA EMULSÃO MÚLTIPLA EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA INTERNA E EMULSÃO PRIMÁRIA

Amostra	Proporção EP:A <sub>2</sub>	Tensoativo %	EHL final
Am 113	1:1	3	8,250
Am 123	1:2	3	9,630
Am 133	1:3	3	10,500
Am 113,5	1:1	3,5	8,769
Am 123,5	1:2	3,5	10,120
Am 133,5	1:3	3,5	10,950

FONTE: A Autora (2016).

NOTA: EP=emulsão primária, A<sub>2</sub>= fase aquosa externa, EHL= Equilíbrio hidrófilo-lipófilo; Am refere-se a amostra, os dois números seguintes relacionam-se a proporção de fases e o terceiro número a quantidade de tensoativo.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE EMULSÃO MÚLTIPLA PARA TESTE DAS PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA EXTERNA E TENSOATIVO

	Am 113	Am 123	Am 133	Am 113,5	Am 123,5	Am 133,5
Emulsão primaria	50	33,3	25	50	33,3	25
Polisorbato 80	3	3	3	3,5	3,5	3,5
Água	47	63,7	72	46,5	63,2	71,5

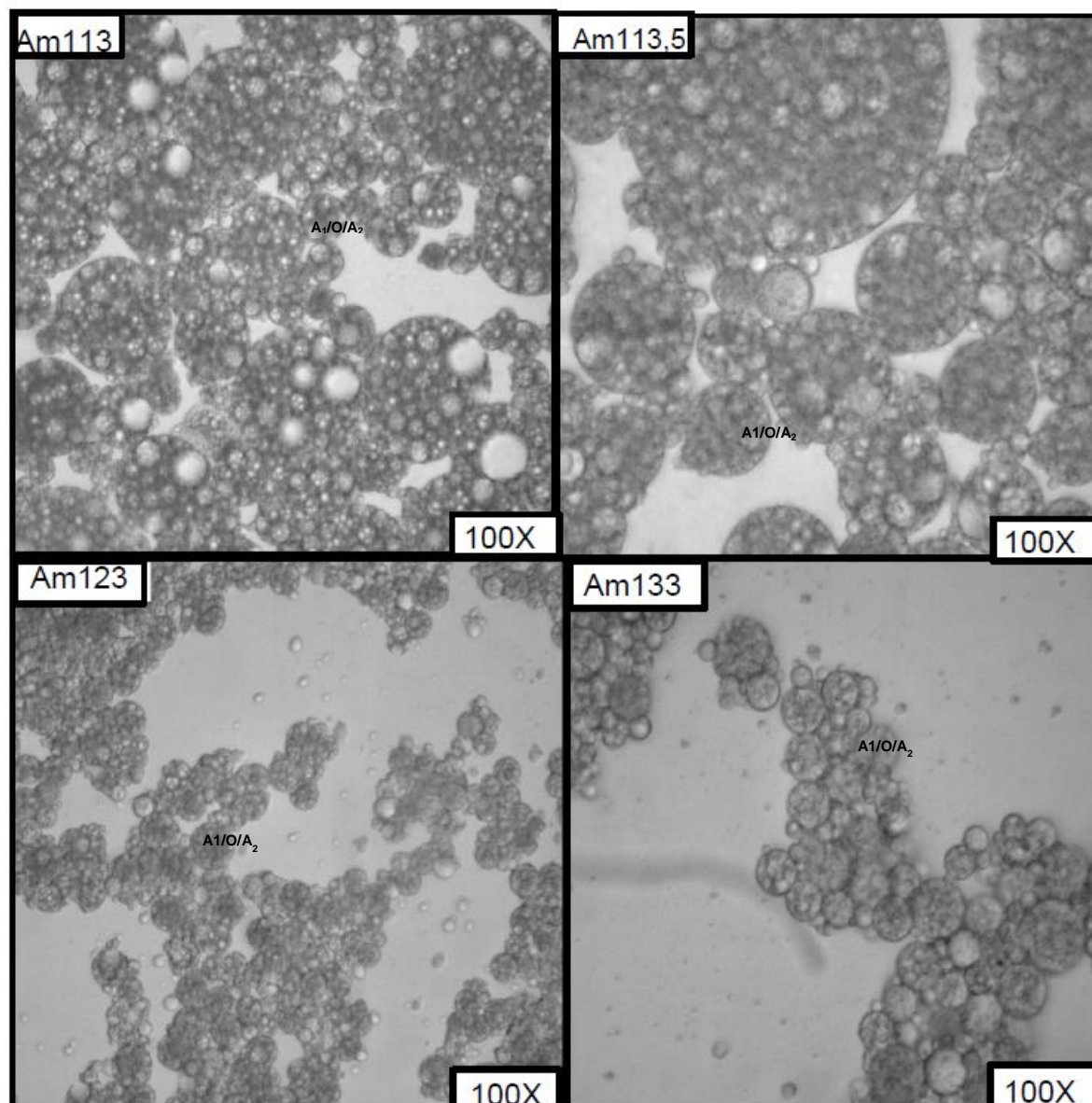
FONTE: A Autora (2016).

NOTA: Am refere-se a amostra, os dois números seguintes relacionam-se a proporção de fases e o terceiro número a quantidade de tensoativo.

Após 2 dias ocorreu a separação de fases nas formulações Am 133 e Am133,5. As formulações Am 113 e 113,5 apresentaram glóbulos múltiplos A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> e bolhas de ar (geradas pela agitação). A formulação 113,5 apresentou separação de fases após 7 dias e a formulação 113,5 apresentou separação de fases após 10 dias de armazenamento. A FIGURA 12 apresenta imagens obtidas, por meio da microscopia ótica das amostras preparadas para a seleção de proporção de fases da emulsão múltipla.

De acordo com Frenkel et al. (1983) quando o EHL da emulsão múltipla é maior que 10 ocorre a inversão de fases e a formação de uma emulsão primária O/A, por outro lado valores muito baixos de EHL resultariam na formação de emulsões primária A/O. Em estudo realizado por Schmidts et al. (2009) ocorreu a formação de emulsões múltiplas para valores superiores de EHL, demonstrando assim que dependendo da natureza do tensoativo é possível a formação destes sistemas. Para o desenvolvimento da emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> contendo o ácido gálico o valor EHL que apresentou a melhor estabilidade foi 8,769 utilizando a proporção emulsão primária: fase aquosa externa (A<sub>1</sub>/O:A<sub>2</sub>) igual 1:1, e 3,5% de tensoativo lipofílico polisorbato 80.

FIGURA 12 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO MÚLTIPLA A1/O/A2 PARA A SELEÇÃO DAS PROPORÇÕES DE FASE AQUOSA EXTERNA E EMULSÃO PRIMÁRIA COM O TENSOATIVO SECUNDÁRIO POLISORBATO 80



FONTE: A Autora (2016).

#### 4.3.2 Seleção do polissacarídeo na fase aquosa externa da emulsão

Ocorreu a formação da emulsão múltipla com ambos os polissacarídeos, como pode ser observado na FIGURA 13, onde é apresentada a microscopia ótica das amostras, sendo possível observar a formação de glóbulos múltiplos água-em-óleo-em-água. Deste modo, a seleção do polissacarídeo foi feita por meio da observação da estabilidade das amostras.

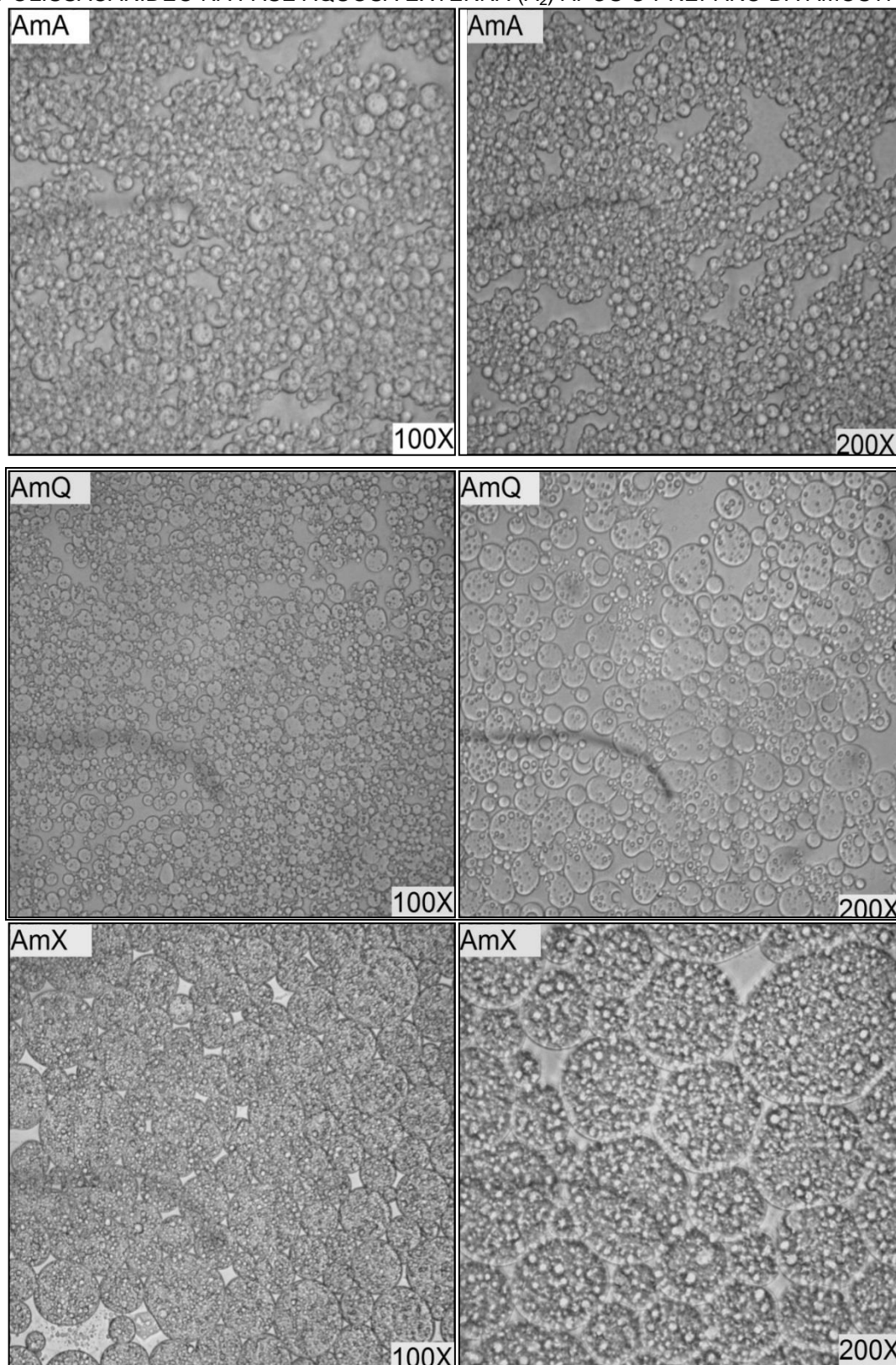
A amostra preparada com a utilização de quitosana como polissacarídeo presente na fase externa apresentou a migração das moléculas de ácido gálico para a fase externa e possível oxidação dessa molécula, evidenciada pela formação de uma coloração escura na amostra.

O polissacarídeo selecionado para a utilização na estabilização da emulsão múltipla foi a goma xantana, pois esta apresentou maior estabilidade dos glóbulos da emulsão múltipla, durante a análise de 14 dias, quando comparada a amostra preparada com alginato de sódio.

Os polissacarídeos alginato de sódio, quitosana e goma xantana, selecionados para a adição a emulsão múltipla pertencem a categoria dos agentes espessantes capazes de gelificar a fase externa sem se adsorverem a interface. (PARASKEVOPOULOU et al., 2005).

Segundo Leal-Calderon et al. (2007) a utilização de polissacarídeos inibe a cremeação durante longos períodos de armazenamento. Isso ocorre devido a rede formada pelo polissacarídeo que impede o movimento dos glóbulos de óleo dispersos na emulsão, ou seja, apesar das flutuações dos glóbulos a estrutura formada pelo polímero faz com que esses fiquem imobilizados. Sendo a rede formada pela goma xantana é capaz de ser um estabilizador eficiente para suspensões e emulsões. A conformação ordenada da goma xantana é responsável pela estabilidade do polímero e essa é estabilizada pela presença de sal. (KATZBAUER, 1998).

FIGURA 13 - MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO MÚLTIPLA PARA A SELEÇÃO DO POLISSACARÍDEO NA FASE AQUOSA EXTERNA ( $A_2$ ) APÓS O PREPARO DA AMOSTRA



FONTE: A autora (2017)

NOTA: AmA= Emulsão múltipla com alginato de sódio na fase  $A_2$ ; AmQ= Emulsão múltipla com quitosana na fase  $A_2$ ; AmX=Emulsão múltipla com goma xantana na fase  $A_2$ ; 100X= aumento de 100 vezes no microscópio ótico ; 200X= aumento de 200 vezes no microscópio ótico.

### 4.3.3 Influência da temperatura e ordem de adição da emulsão primária a fase aquosa externa

Foram preparadas emulsões múltiplas ( $A_1O/A_2$ ) alterando a ordem de adição da emulsão primária e da fase aquosa externa e testando simultaneamente a influência da temperatura, sendo os resultados de estabilidade preliminar expressos na TABELA 11.

A emulsão que apresentou maior estabilidade foi a emulsão preparada sem o aquecimento das fases na qual a emulsão primária  $A_1/O$  foi vertida sobre a fase aquosa  $A_2$  (água +goma xantana).

TABELA 11 - RESULTADO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS AMOSTRAS TESTADAS PARA ANÁLISE DA INFLUENCIA DA TEMPERATURA E ORDEM DE ADIÇÃO DA EMULSÃO PRIMARIA E A FASE AQUOSA EXTERNA APÓS 7 DIAS

Temperatura	Fase Aquosa externa sobre Emulsão primária	Emulsão primária sobre Fase Aquosa externa
Ambiente (20°C)	Cremeação	Normal
Aquecimento (40°C)	Separação de fases	Cremeação

FONTE: A Autora (2016)

A exposição a temperaturas altas pode induzir reações de oxidação e degradação em polifenóis (ROBERT et al., 2012), assim é preferível a utilização de técnicas de preparo que não exponham o ativo a variações de temperatura.

Gomes et al. (2016) associaram a diminuição da concentração de ácido gálico na emulsão A/O do seu estudo, ao mecanismo de alta agitação utilizado, que resultou em aumento da temperatura próxima ao rotor e incorporação de oxigênio ocasionando a oxidação do ativo. Desse modo a obtenção de uma emulsão múltipla estável após preparo em temperatura ambiente corrobora para a estabilidade do ácido gálico na fase aquosa interna.

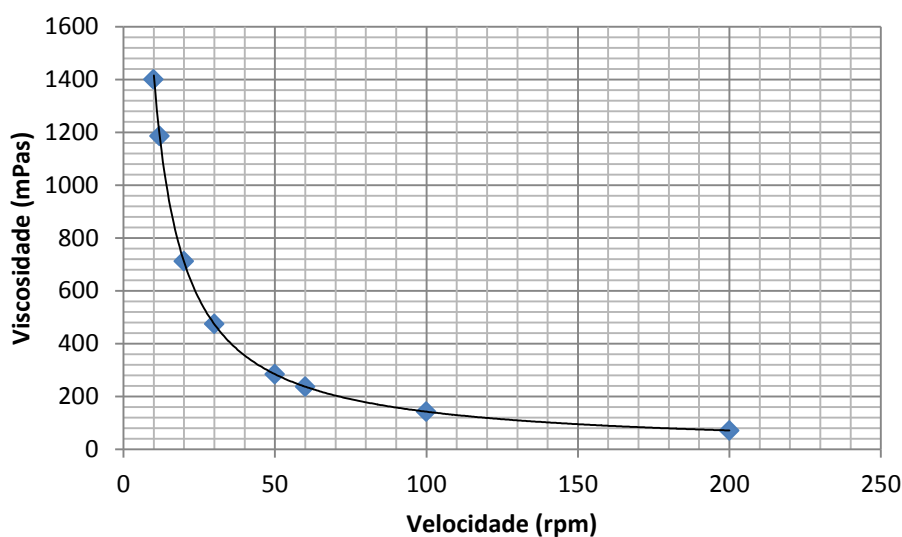
## 4.4 ANÁLISE DA EMULSÃO MÚLTIPLA CONTENDO ÁCIDO GÁLICO

### 4.4.1 Determinação da viscosidade

A emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo ácido gálico na fase aquosa interna apresentou viscosidade variável de acordo com a velocidade aplicada sobre a formulação a temperatura constante (GRÁFICO 6). Com o aumento da velocidade

ocorre aumento da taxa de cisalhamento, considerando essa relação, a emulsão não apresentou comportamento Newtoniano, pois quando variou-se a taxa de cisalhamento a viscosidade não permaneceu constante. O comportamento reológico apresentado pela emulsão foi compatível com o comportamento pseudoplástico, uma vez que ao aumentar a taxa de cisalhamento ocorreu a diminuição da viscosidade da emulsão múltipla.

GRÁFICO 6 - VISCOSIDADE DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  CONTENDO ÁCIDO GÁLICO (mPas) versus VELOCIDADE (rpm)



FONTE: A Autora (2017)

Em estudo realizado por Pal (1998), concluiu-se que a viscosidade das emulsões aumenta proporcionalmente com a diminuição do tamanho dos glóbulos, assim emulsões com glóbulos menores apresentam maior viscosidade do que emulsões constituídas de glóbulos maiores e heterogêneas.

Pal (2008) propôs quatro modelos de equações para a determinação da viscosidade em emulsões múltiplas, exemplificado aqui para a emulsão  $A_1/O/A_2$ , onde nos dois primeiros modelos a viscosidade depende de quatro variáveis, a razão do volume entre a fase aquosa interna ( $A_1$ ) e a fase oleosa (O); a razão entre a viscosidade da fase oleosa (O) pela fase aquosa externa ( $A_2$ ); a razão entre a viscosidade da fase aquosa interna pela fase oleosa; e a fração volumétrica da emulsão  $A_1/O$  em relação a emulsão múltipla. Para os outros dois modelos, também é considerada a fração volumétrica máxima possível da emulsão  $A_1/O$  sem que

ocorra alterações nos glóbulos. Quando há glóbulos múltiplos dentro do glóbulo oleoso é considerada também a tensão interfacial entre os glóbulos.

Uma vez que a viscosidade de uma emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  é dependente da fração volumétrica da emulsão ( $A_1/O$ ) em relação a emulsão múltipla, a difusão das moléculas de água, causada pela pressão osmótica, entre a fase interna e externa altera o volume da fração e conseqüentemente a viscosidade (JIAO; BURGESS, 2003). Essa alteração pode ocorrer diluindo-se as amostras, assim ao aumentar a fase dispersante ocorre o inchaço osmótico dos glóbulos internos e conseqüentemente dos glóbulos oleosos, o que ocasiona um aumento da fração interna na emulsão múltipla e resulta em viscosidades mais altas quando comparado a emulsões convencionais (IQBAL et al., 2013). Outra variável que causa alteração é a presença de sais na fase interna que faz com que ocorra o inchaço dos glóbulos da emulsão  $A_1/O$  e aumente o volume da fração interna o que ocasiona o aumento da viscosidade, podendo indicar aumento da estabilidade. Por outro lado o inchaço dos glóbulos pela migração das moléculas de água pode levar ao seu rompimento e a desestabilização do sistema múltiplo (JIAO; BURGESS, 2003).

#### 4.4.2 Teste de estabilidade

##### 4.4.2.1 Determinação do valor de pH

O pH da emulsão múltipla permaneceu estável, dentro da faixa do sistema tamponante pH 5,0. Os valores estão expressos na TABELA 12.

TABELA 12 - VALORES OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE PH DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  DURANTE 28 DIAS

	1ºDia	7º Dia	14ºDia	21ºDia	28ºDia
pH ± DP	5,03 ± 0,03	5,07 ± 0,04	5,17 ± 0,03	5,2 ± 0,03	5,23 ± 0,04
DPR %	0,57	0,79	0,62	0,50	0,83

FONTE: A autora (2016)

NOTA: DP = Desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo

A medida do pH ao longo do tempo auxilia na avaliação da estabilidade da formulação, visto que alterações nos valores podem gerar incompatibilidades e degradação dos componentes (CHORILLI et al., 2009).

A estabilidade e a vida útil de uma emulsão estão diretamente relacionadas ao tamanho dos glóbulos e a interação entre os componentes na fase dispersa, esses são dependentes do pH, uma vez que podem alterar o comportamento de determinadas moléculas modificando as propriedades das interfaces (FELIX et al., 2017).

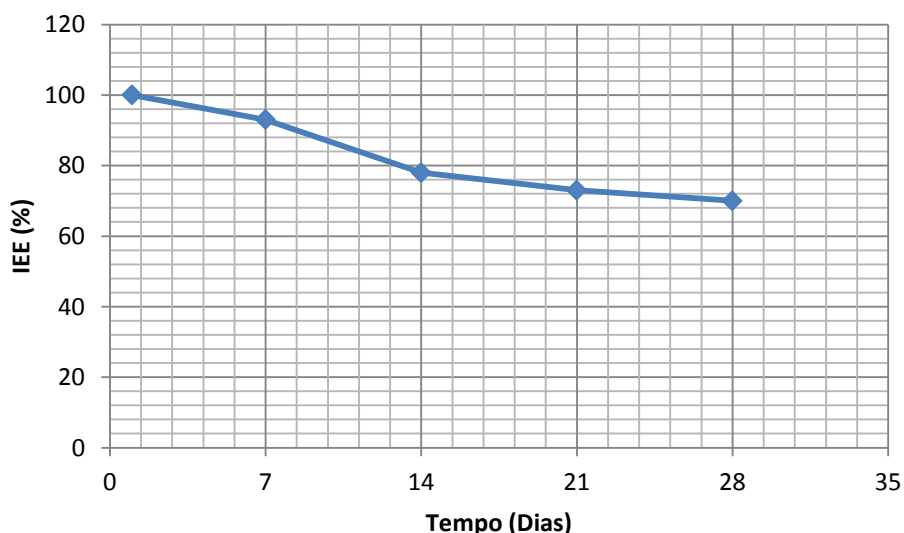
O pH de uma emulsão pode apresentar diminuição quando ocorre oxidação da fase oleosa, com formação de cadeias oxidadas (hidroperóxidos), ou uma hidrólise de triglicerídeos, que resulta na formação de ácidos graxos livres (MASMOUDI et al., 2005).

O pH da emulsão múltipla desenvolvida não apresentou variação indicando que as moléculas presentes na formulação não foram oxidadas e não houve alteração molecular na interface.

#### 4.4.2.2 Estabilidade cinética

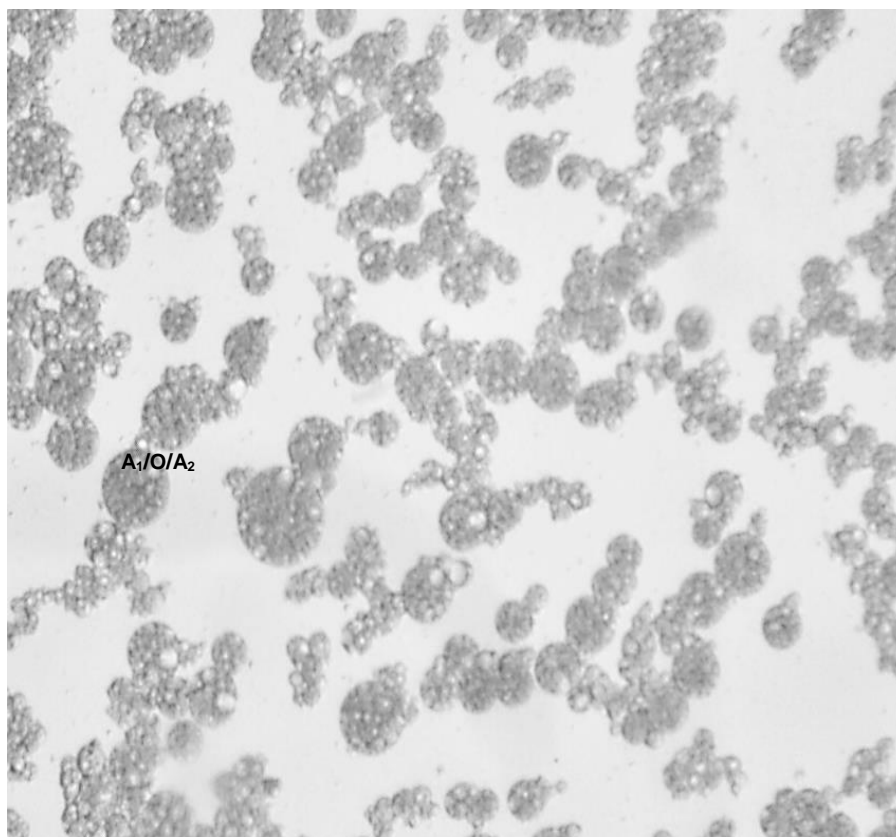
A emulsão múltipla desenvolvida nesse trabalho apresentou leve floculação (FIGURA 14) e cremeação afetando o índice de estabilidade da emulsão (IEE), como demonstrado no GRÁFICO 7.

GRÁFICO 7 - ÍNDICE DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO (IEE%) DURANTE 28 dias de armazenamento



FONTE: A Autora (2017)

FIGURA 14 - MICROSCOPIA ÓTICA (100x) DA EMULSÃO MÚLTIPLA  $A_1/O/A_2$  PARA ANÁLISE DA ESTABILIDADE, APÓS 14 DIAS DE PREPARO



FONTE: A autora (2016)

A cremação ocorre quando glóbulos pequenos sobem para a parte superior da emulsão, pois esses sofrem menor ação da força da gravidade, esse fenômeno acontece principalmente pela diferença de densidade entre a fase contínua e a fase dispersa (COFRADES et al., 2013).

As emulsões não floculadas apresentam uma maior resistência a cremação induzida pela gravidade devido ao movimento Browniano dos glóbulos. Já em emulsões levemente floculadas deve ser considerada a interação de curto alcance entre os glóbulos floculados, deste modo a cremação é a consolidação de uma rede parcialmente agregada (ROBINS et al., 2002).

A utilização de polímeros e tensoativos para a estabilização dos glóbulos contra a coalescência pode induzir interações que afetam as propriedades reológicas e a cremação da emulsão (ROBINS et al., 2002).

Uma emulsão na qual houve a adição de polímeros possui uma fase contínua mais viscosa, o que diminui a mobilidade e a coalescência dos glóbulos, além de retardar a cremação. Logo, o aumento da viscosidade juntamente com a

equiparação das densidade dos glóbulos e da fase dispersante, previnem a cremeação da emulsão (TABATABAEE AMID; MIRHOSSEINI, 2014). Por outro lado, o aumento excessivo da viscosidade pode resultar em instabilidade dos glóbulos oleosos (BENNA-ZAYANI et al., 2008).

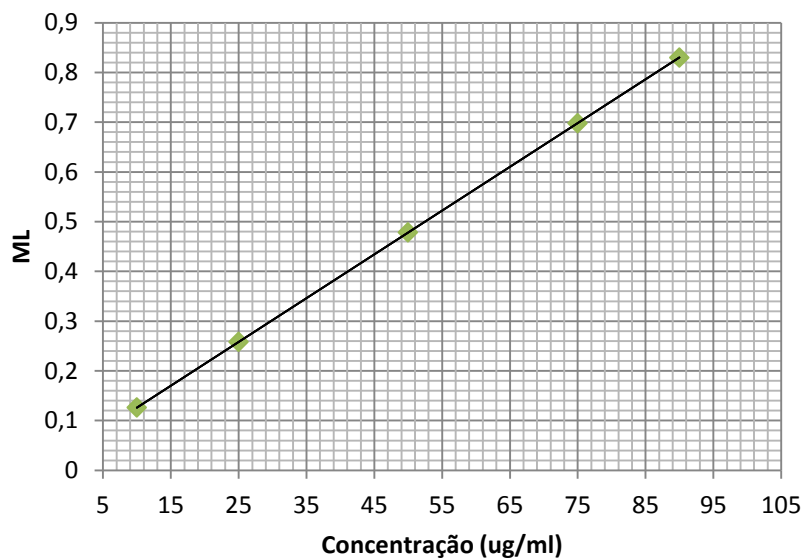
A presença da goma xantana na fase aquosa ( $A_2$ ) externa da emulsão possibilitou uma maior estabilidade quanto a prevenção da coalescência dos glóbulos, porém a concentração utilizada ainda deverá ser ajustada para a prevenção da cremeação durante um longo período de armazenamento.

#### 4.4.2.3 Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais tem por base a reação entre o reagente Folin-Ciocalteu, composto pelos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico presentes no estado de oxidação 6+, que em meio básico na presença de polifenóis sofre redução originando molibdênio azul e tungstênio azul, que conferem coloração azul a solução proporcionalmente a concentração (SOUSA et al., 2007).

Para a determinação de fenóis totais, inicialmente foi construída uma curva de calibração (GRÁFICO 8) com concentrações de  $2,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a qual apresentou a equação da reta  $y=0,0088x + 0,0381$ , na qual o y corresponde a absorbância encontrada no comprimento de onda de 760nm e x a concentração do ácido gálico, e coeficiente de regressão linear de 0,9983.

GRÁFICO 8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS  
 $\lambda = 760 \text{ NM}$



FONTE: A Autora (2016)

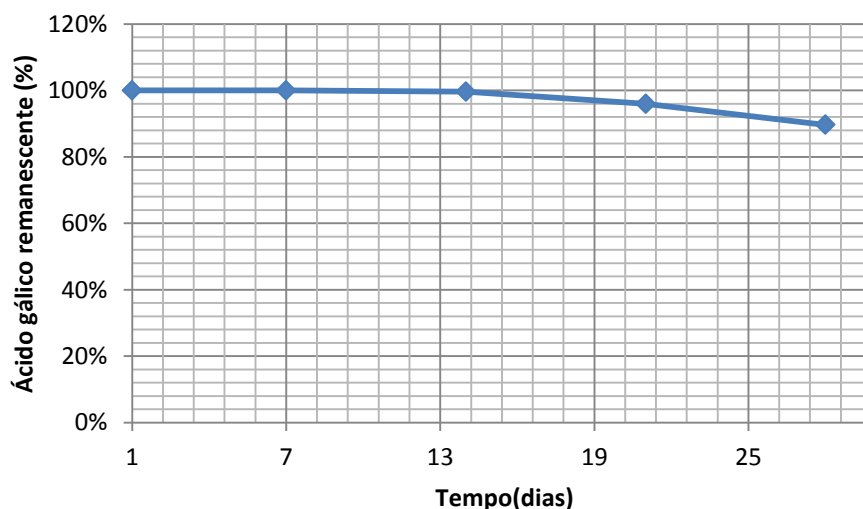
A concentração de ácido gálico encontrada durante o período avaliado demonstrou que a formulação apresenta a capacidade de o proteger contra a oxidação causada pela exposição ao oxigênio, como demonstrado na TABELA 13 e GRÁFICO 9.

TABELA 13 - QUANTIDADE DE ÁCIDO GÁLICO PRESENTE NA EMULSÃO MÚLTIPLA(A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub>) DURANTE 28 DIAS

	1ºDia	7 Diaº	14ºDia	21ºDia	28ºDia
% de ácido gálico na A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub>	100%	100%	99,62%	95,92%	89,61%
DPR(%)	2,18	4,84	4,59	2,07	1,99

FONTE: A autora (2016)

GRÁFICO 9 - ESTABILIDADE DO ÁCIDO GÁLICO NA EMULSÃO A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> DURANTE 28 DIAS



FONTE: A autora (2016)

Após 28 dias de armazenamento em temperatura ambiente a emulsão múltipla apresentou 89,61% do ácido gálico adicionado inicialmente à formulação, demonstrando alta capacidade de proteção.

Em estudo realizado por Gomes et al. (2016), foram desenvolvidas emulsões simples A/O e O/A, quando avaliada a concentração de fenóis totais foram encontrados valores maiores que 86,61%, analisadas durante um período de 7 dias, para as diferentes concentrações de tensoativos (PGPR ou polisorbato 20). Os autores sugerem que os tensoativos foram responsáveis pela migração do ácido gálico para a interface da emulsão fazendo com que fosse mais ou menos exposto ao ar. Para a emulsão A/O a migração do polifenol induzida pelo tensoativo PGPR fez com que o ativo fosse mais exposto ao ar e conseqüentemente oxidado, por outro lado na emulsão O/A a migração induzida pelo polisorbato 20 fez com que o ácido gálico fosse protegido. Durante o processo de obtenção dessas emulsões foram utilizadas técnicas que utilizavam alta agitação e assim incorporavam ar na emulsão o que ocasionou a degradação do ácido durante a produção (GOMES et al., 2016).

Para as emulsões múltiplas  $A_1/O/A_2$ , após 7 dias de preparo não houve variação na concentração de ácido gálico inicial. A manutenção do ácido gálico na formulação pode ser justificada pela presença de duas interfaces (tornando mais difícil a exposição do ativo ao oxigênio) e pela baixa incorporação de ar (resultante da baixa velocidade utilizada durante a emulsificação). Deste modo, os resultados obtidos estão concordantes com os estudos na literatura.

#### 4.4.2.4 Determinação da atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante determinada por meio do método de redução do complexo de fosfomolibdênio baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, obtendo uma solução de coloração esverdeada pela formação do complexo fosfato-molibdênio V (PRIETO et al., 1999).

Os resultados obtidos após a análise da atividade antioxidante estão expressos na TABELA 14 e GRÁFICO 10.

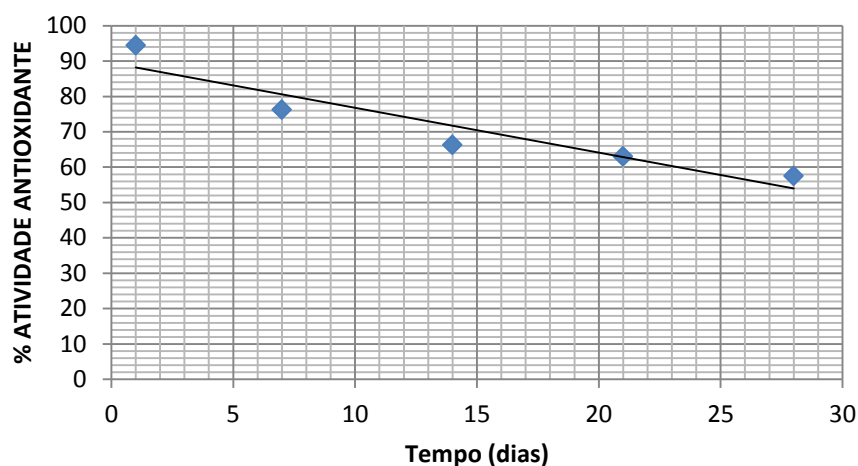
TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> DURANTE 28 DIAS

	1ºDia	7 Dia	14ºDia	21ºDia	28ºDia
% AA	94,39	76,22	66,25	62,95	57,46

FONTE: A autora (2016)

NOTA: %AA = Atividade antioxidante remanescente na emulsão múltipla

GRÁFICO 10 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DA EMULSÃO MÚLTIPLA A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> DURANTE 28 DIAS



FONTE: A autora (2016)

Ao observar a atividade antioxidante no 1º dia de análise é possível suspeitar de incorporação de oxigênio durante a produção da formulação, o que justifica o decaimento para o valor de 94,39%.

A emulsão múltipla apresentou atividade antioxidante após 28 dias equivalente a 57,46% da atividade inicial (essa é dependente da quantidade de ácido gálico adicionada a amostra). A diminuição da atividade antioxidante pode ocorrer pela proteção contra a oxidação lipídica, a exposição ao ar e a variações de temperatura (GOMES et al., 2016). Apesar de ocorrer a diminuição da capacidade antioxidante da formulação, essa ainda apresentou valores superiores a 50% após 28 dias o que possibilita a utilização para o transporte do ácido gálico como antioxidante.

## 5 CONCLUSÃO

As emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água  $A_1/O/A_2$  são sistemas de alta complexidade e de difícil estabilização. Para o desenvolvimento de uma formulação estável contendo o ácido gálico foram avaliados variáveis de composição e de processo. As variáveis de composição analisadas foram tensoativo lipofílico, sistema tamponante, eletrólitos na fase aquosa interna, tensoativo hidrofílico e polissacarídeos na fase aquosa externa. As variáveis de processo analisadas foram o aquecimento das fases e a ordem de adição na segunda etapa de emulsificação.

Na determinação da solubilidade do ácido gálico em água e etanol anidro foram encontrados os valores de 1,388 ( $\pm 0,032$ ) e 17,72 ( $\pm 0,48$ ), respectivamente, ao quais são compatíveis com os presentes na literatura.

O método desenvolvido para a quantificação do ácido gálico em fase aquosa mostrou-se específico, linear, reprodutível, preciso, exato e robusto, sendo adequado para a análise da estabilidade do ácido gálico nas soluções de coexcipientes. Os coexcipientes testados (NaCl,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ , glucose e sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0) para a adição na fase aquosa interna não apresentaram interação significativa na estabilidade do ácido gálico quantificado por CLAE-UV.

A emulsão múltipla  $A_1/O/A_2$  contendo ácido gálico na fase aquosa interna foi preparada por dupla emulsificação, sendo utilizada na emulsão primária  $A_1/O$ : óleo de canola, tensoativo lipofílico PGPR, cloreto de sódio, ácido gálico sistema tamponante acetato de sódio pH 5,0. O PGPR foi capaz de formar um filme interfacial com característica viscoelástica, capaz de suportar a variação de volume da fase aquosa interna sem a ruptura dos glóbulos da emulsão. A utilização de sistema tamponante auxiliou na estabilização da molécula de ácido gálico e juntamente com o cloreto de sódio compensou a pressão de LaPlace diminuindo a ocorrência de ruptura dos glóbulos.

Na segunda etapa de emulsificação foi adicionado o polissacarídeo goma xantana a fase aquosa externa ( $A_2$ ) da emulsão e o tensoativo hidrofílico polisorbato 80. Ocorreu aumento da estabilidade da emulsão por meio do aumento de viscosidade da fase aquosa externa. O EHL da emulsão múltipla no qual houve maior estabilidade foi 8,769.

Após a análise da estabilidade, durante 28 dias, foi verificado que o ácido gálico apresentou estabilidade dentro da formulação proposta apresentando 89,61% da concentração do ácido gálico inicial e 57,46% da atividade antioxidante inicial.

Os resultados apresentados demonstraram que a emulsão múltipla A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> desenvolvida manteve-se estável por 28 dias sendo capaz de carrear o ácido gálico para fins farmacêuticos e/ou alimentares.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKI, K.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, R.; FADAVI, G.; MEYBODI, N. M. The effect of pH and salt on the stability and physicochemical properties of oil-in-water emulsions prepared with gum tragacanth. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 342–348, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171501259X>>. .
- ADITYA, N. P.; ADITYA, S.; YANG, H.; et al. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. **Food Chemistry**, v. 173, p. 7–13, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.131>>. .
- ADITYA, N. P.; ADITYA, S.; YANG, H. J.; et al. Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 35–43, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>>. .
- AKHTAR, N.; AHMAD, M.; KHAN, H. M. S.; et al. Formulation and Characterization of a Multiple Emulsion Containing 1% L-Ascorbic Acid. **Chemical Society of Ethiopia**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2010.
- ANDRY, M. C.; VEZIN, H.; DUMISTRACEL, I.; BERNIER, J. L.; LÉVY, M. C. Proanthocyanidin microcapsules: Preparation, properties and free radical scavenging activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 171, n. 2, p. 217–226, 1998.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.
- ARAUJO, G. L. B. DE; PITALUGA, A.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. D. O. P.; MATOS, J. D. R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27–36, 2012.
- ARONSON, M. P.; PETKO, M. F. Highly Concentrated Water-in-oil Emulsions: Influence of Electrolyte on Their Properties and Stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 159, p. 134–149, 1993.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY Advances**, v. 5, p. 27540–27557, 2015. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA01911G>>. .
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BAYELE, H. K.; DEBNAM, E. S.; SRAI, K. S. Biochemical and Biophysical Research Communications Nrf2 transcriptional derepression from Keap1 by dietary polyphenols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 3, p. 521–528, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.103>>. .

BENNA-ZAYANI, M.; KBIR-ARIGUIB, N.; TRABELSI-AYADI, M.; GROSSIORD, J. L. Stabilisation of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 316, n. 1–3, p. 46–54, 2008.

BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; et al. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385–394, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901500148X>>. .

BOU, R.; COFRADES, S.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 621–628, 2014.

BOUYER, E.; MEKHLLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052>>. .

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**. v. 2, p.1–523, 2010.

BRAUN, D. E.; BHARDWAJ, R. M.; FLORENCE, A. J.; TOCHER, D. A.; PRICE, S. L. Complex Polymorphic System of Gallic Acid—Five Monohydrates, Three Anhydrides, and over 20 Solvates. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 1, p. 19–23, 2013. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/cg301506x>>. .

CALABRISO, N.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; et al. Extra virgin olive oil rich in polyphenols modulates VEGF-induced angiogenic responses by preventing NADPH oxidase activity and expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 19–29, 2016.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415–1422, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>>. .

CARLUCCIO, M. A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M. A.; et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 4, p. 622–629, 2003.

CARVALHO, J. L. DE S. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., BRASSICACEAE**, 2008. Universidade Federal do Paraná.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCI, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 282–291, 2000.

CHANG, Y.; YANG, M.; CHEN, S.; WANG, C. Mulberry leaf polyphenol extract improves obesity by inducing adipocyte apoptosis and inhibiting preadipocyte differentiation and hepatic lipogenesis. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 249–262, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.033>>.

CHENG, J.; CHEN, J. F.; ZHAO, M.; et al. Transport of ions through the oil phase of W1/O/W2 double emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 305, n. 1, p. 175–182, 2007.

CHOI, D. Y.; LEE, Y. J.; HONG, J. T.; LEE, H. J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 2–3, p. 144–153, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.014>>.

CHORILLI, M.; CAMPOS, GABRIELA R.; BOLFARINI, POLIANA M. . Development and Study of the Physicochemical Stability of W / O / W and O / W / O Multiple Emulsions increased of Chemical ... Desenvolvimento e Estudo da Estabilidade Físico-Química. **Latin American Journal of Pharmacy**, , n. March, 2009.

CHUNG, C.; MCCLEMENTS, D. J. Structure-function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. **Food Structure**, v. 1, n. 2, p. 106–126, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2013.11.002>>.

CLAESSON, P. M.; NINHAM, B. W. pH-Dependent Interactions between Adsorbed Chitosan Layers. **Langmuir**, v. 8, n. 5, p. 1406–1412, 1992.

CLARKE, H. D.; ARORA, K. K.; WOJTAS, Ł.; ZAWOROTKO, M. J. Polymorphism in Multiple Component Crystals: Forms III and IV of Gallic Acid Monohydrate. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 4, p. 964–966, 2011. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/cg2001865>>.

CLERGEAUD, G.; DABBAGH-BAZARBACHI, H.; ORTIZ, M.; FERNÁNDEZ-LARREA, J. B.; SULLIVAN, C. K. O. A simple liposome assay for the screening of zinc ionophore activity of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 197, p. 916–923, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.057>>.

COFRADES, S.; ANTONIOU, I.; SOLAS, M. T.; HERRERO, A. M.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 338–346, 2013.

COLE, M. L.; WHATELEY, T. L. Preparation of Stable Multiple W/O/W Emulsion Using Pluronic (polaxamer): Poly (acrylic Acid) Complexes. **Journal of Colloid and Interface Science**, 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, n. 1, p. 51–58, 1997.

COSTA, T. R. **Avaliação da atividade antioidiáica do extrato vegetal de Anacardium humile : Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**, 2010. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO.

DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S.; HOMAYOUN, N. Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, p. 776–778, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/je700633w>>. .

DAWN, H.; CLARKE, M. **Crystal Engineering of Multi-Component Crystal Forms : The Opportunities and Challenges in Design**, 2012. University of South Florida.

DELAMPLE, M.; SILVA, F. DA; LEAL-CALDERON, F. Osmotically driven gelation in double emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 11–19, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.009>>. .

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25–39, 2003.

DUDARIĆ, L.; FUŽINAC-SMOJVER, A.; MUHVIĆ, D.; GIACOMETTI, J. The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. **Food Research International**, v. 77, p. 290–298, 2015.

ESLAMI, A. C.; PASANPHAN, W.; WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. **Chemistry Central Journal**, v. 4, p. 15, 2010. BioMed Central. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924338/>>. .

ESLAMI, P.; DAVARPANAH, L.; VAHABZADEH, F. Encapsulating role of  $\beta$ -cyclodextrin in formation of pickering water- in-oil-in-water (  $W_1 / O / W_2$  ) double emulsions containing *Lactobacillus delbrueckii*. **Food hydrocolloids**, v. 64, p. 133–148, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.035>>. .

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>>. .

FELIX, M.; ROMERO, A.; GUERRERO, A. Viscoelastic properties, microstructure and stability of high-oleic O/W emulsions stabilised by crayfish protein concentrate and xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 9–17, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.028>>. .

FERK, F.; CHAKRABORTY, A.; JÄGER, W.; et al. Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: results of human and animal experiments. **Mutation research**, v. 715, n. 1–2, p. 61–71, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510711001862>>. .

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, n. 1, p. 243–256, 1981.

FRENKEL, M.; SHWARTZ, R.; GARTI, N.; NISSIM, G. Multiple Emulsions I. Stability: Inversion, Apparent and Weighted HLB. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 94, n. 1, p. 174–178, 1983.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101–2110, 2000.

GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; DE ASSIS PERRECHIL, F.; DA CUNHA, R. L. Role of the phases composition on the incorporation of gallic acid in O/W and W/O emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 205–214, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877415003507>>. .

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal of Cosmetic Science**, v. 1, n. 5, p. 311–326, 1949. Disponível em: <<http://journal.sconline.org/pdf/cc1949/cc001n05/p00311-p00326.pdf>>. .

GRUNDHÖFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 915–927, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942201000991>>. Acesso em: 13/10/2015.

GÜLSEREN, I.; CORREDIG, M. Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 193–198, 2012.

HATTREM, M. N.; DILLE, M. J.; SETERNES, T.; DRAGET, K. I. Macro- vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 77–85, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.024>>. .

HERZI, S.; ESSAFI, W.; BELLAGHA, S.; LEAL-CALDERON, F. Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 489–495, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.09.036>>. .

HO, H. H.; CHANG, C. SEN; HO, W. C.; et al. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- $\kappa$ B activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 1, p. 76–85, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.019>>. .

HSIEH, S. C.; WU, C. H.; WU, C. C.; et al. Gallic acid selectively induces the necrosis of activated hepatic stellate cells via a calcium-dependent calpain i activation pathway. **Life Sciences**, v. 102, n. 1, p. 55–64, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.041>>. .

IQBAL, S.; BALOCH, M. K.; HAMEED, G.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1613–1620, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.035>>. .

JIAO, J.; BURGESS, D. J. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. **AAPS pharmSci**, v. 5, n. 1, p. E7, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2751475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 64–74, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.040>>. .

KAIMAINEN, M.; MARZE, S.; JARVENPAA, E.; ANTON, M.; HUOPALAHTI, R. Encapsulation of betalain into w / o / w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 899–904, 2015.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 81–84, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001808>>. .

KAWASHIMA, Y.; HINO, T.; TAKEUCHI, H.; NIWA, T. Stabilization of water/oil/water multiple emulsion with hypertonic inner aqueous phase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 5, p. 1240–1246, 1992. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026766865&partnerID=40&md5=674df0b5a55b7505b7baaf6e4224515f>>. .

KOYAMA, A.; BITSCH, I. Human Nutrition and Metabolism – Research Communication Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans 1. **The Journal of Nutrition**, v. 1, n. September 2000, p. 1207–1210, 2001.

KUMAR, K. J. S.; VANI, M. G.; WANG, S.-Y.; et al. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases. **Biofactors (Oxford, England)**, v. 39, n. 3, p. 259–270, 2013. Department of Cosmeceutics, College of Pharmacy, China Medical University, Taichung, Taiwan.: los Press. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=23322673&lang=pt-br&site=ehost-live&authtype=ip,cookie,uid>>. .

LEAL-CALDERON, F.; HOMER, S.; GOH, A.; LUNDIN, L. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 30–41, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.004>>. .

LEAL-CALDERON, F.; THIVILLIERS, F.; SCHMITT, V. Structured emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 206–212, 2007.

LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake , cell proliferation , and 5-lipoxygenase activity. **Nutrition Research**, v. 28, n. 12, p. 842–850, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2008.09.001>>. .

LEÓN-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 371–380, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>>. .

LI, L.; NG, T. B.; GAO, W.; et al. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life sciences**, v. 77, n. 2, p. 230–40, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862607>>. .

LIMA, K. G. **AValiação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2**, 2014. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233–239, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412006642>>. Acesso em: 13/10/2015.

LU, L.-L.; LU, X.-Y. Solubilities of Gallic Acid and Its Esters in Water. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, n. 1, p. 37–39, 2007. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jc0601661>>. .

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-Based Encapsulation and Delivery Systems for Polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1–9, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500240X>>. .

LV, G.; WANG, F.; CAI, W.; ZHANG, X. Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 447, p. 8–13, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.066>>. .

MANSOURI, M. T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M. J.; et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1028–1033, 2013. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medl&AN=23411210>>  
<[http://bf4dv7zn3u.search.serialssolutions.com.myaccess.library.utoronto.ca/?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft\\_id=info:sid/Ovid:medl&rft.ge](http://bf4dv7zn3u.search.serialssolutions.com.myaccess.library.utoronto.ca/?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft_id=info:sid/Ovid:medl&rft.ge)>. .

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y. LE; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1–2, p. 117–131, 2005.

MASON, T. G. New fundamental concepts in emulsion rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 4, n. 3, p. 231–238, 1999.  
MEDINA-TORRES, L.; GARCÍA-CRUZ, E. E.; CALDERAS, F.; et al. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 642–650, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812003222>>. Acesso em: 27/10/2015.

MEZZENGA, R.; FOLMER, B. M.; HUGHES, E. Design of double emulsions by osmotic pressure tailoring. **Langmuir**, v. 20, n. 9, p. 3574–3582, 2004.

MOTA, F. L.; QUEIMADA, A. J.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. A. Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 15, p. 5182–5189, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ie071452o>>. .

NELSON, DAVID L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 Ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETZ, PAULO A.; ORTEGA, GEORGE GONZÁLEZ. Fundamentos de Físico-Química, uma abordagem conceitual para ciências farmacêuticas. , 2002. Porto Alegre: art.

NOUBIGH, A.; AYDI, A.; MGAIDI, A.; ABDERRABBA, M. Measurement and correlation of the solubility of gallic acid in methanol plus water systems from (293.15 to 318.15) K. **Journal of Molecular Liquids**, v. 187, p. 226–229, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016773221300247X>>. Acesso em: 29/10/2015.

O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 224–231, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.031>>. .

OLGA, G.; STYLIANI, C.; IOANNIS, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 185, p. 33–40, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.058>>. .

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, n. 1, p. 81–84, 1990.

PAL, R. A novel method to correlate emulsion viscosity data. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 137, n. 1–3, p. 275–286, 1998.

PAL, R. On the viscoelastic behavior of multiple emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, n. 2, p. 751–756, 2007.

PAL, R. Viscosity models for multiple emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 3, p. 428–438, 2008.

PARASKEVOPOULOU, A.; BOSKOU, D.; KIOSSEOGLOU, V. Stabilization of olive oil – lemon juice emulsion with polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 627–634, 2005.

PASANPHAN, W.; CHIRACHANCHAI, S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 169–177, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861707004067>>. Acesso em: 27/10/2015.

PAWLIK, A.; COX, P. W.; NORTON, I. T. Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 352, n. 1, p. 59–67, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.049>>. .

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas : formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos Multiple emulsions : formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2015.

- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222007>>. .
- PRISCILLA, D. H.; PRINCE, P. S. M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2–3, p. 118–124, 2009.
- PUNITHAVATHI, V. R.; PRINCE, P. S. M.; KUMAR, R.; SELVAKUMARI, J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 465–71, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863784>>. .
- ROBERT, P.; GARCÍA, P.; REYES, N.; CHÁVEZ, J.; SANTOS, J. J.; et al. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 1–8, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.019>>. Acesso em: 18/10/2015.
- ROBERT, P.; GARCÍA, P.; REYES, N.; CHÁVEZ, J.; SANTOS, J. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612001847>>. Acesso em: 18/10/2015.
- ROBINS, M. M. Emulsions - Creaming phenomena. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, n. 5–6, p. 265–272, 2000.
- ROBINS, M. M.; WATSON, A. D.; WILDE, P. J. Emulsions—creaming and rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 5–6, p. 419–425, 2002.
- ROSA, C. G. DA. **Microencapsulação de extratos metanólicos de amora-preta (Rubus fruticosus) e ácido gálico** PhD Proposal, 2012.
- DA ROSA, C. G.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138–146, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013000277>>. Acesso em: 27/10/2015.
- SANZ-BUENHOMBRE, M.; VILLANUEVA, S.; MORO, C. Bioavailability and the mechanism of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 178–185, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.044>>. .

SAPEI, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. D. D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 316–323, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.008>>. .

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 and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 475, n. 1, p. 55–61, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.040>>. .

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 and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 48–54, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.09.025>>. .

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, n. 1, p. 184–192, 2009.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; SCHLUPP, P.; et al. 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, n. 1–2, p. 107–113, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.037>>. .

SENAPATHY, J. G.; JAYANTHI, S.; VISWANATHAN, P.; UMADEVI, P.; NALINI, N. Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats - A chemopreventive approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 887–892, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.12.012>>. .

SHAHRZAD, S.; AOYAGI, K.; WINTER, A.; KOYAMA, A.; BITSCH, I. Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans 1. **Human Nutrition and Metabolism – Research Communication**, v. 1, n. September 2000, p. 1207–1210, 2001.

SHAO, D.; LI, J.; LI, J.; et al. Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Journal of Food Science**, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12902>>. .

SINGH, D.; SINGH, M.; RAWAT, M.; SEMALTY, A.; SEMALTY, M. Gallic Acid-Phospholipid Complex : Drug Incorporation and Physicochemical Characterization. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 8, n. 3, p. 284–291, 2011.

SŁAWINSKA, D.; POLEWSKI, K.; ROLEWSKI, P.; SŁAWINSKI, J. Synthesis and properties of model humic substances derived from gallic acid. **International Agrophysics**, v. 21, n. 2, p. 199–208, 2007. Disponível em: <[http://www.international-agrophysics.org/artykuly/international\\_agrophysics/IntAgr\\_2006\\_21\\_1\\_199.pdf](http://www.international-agrophysics.org/artykuly/international_agrophysics/IntAgr_2006_21_1_199.pdf)>. .

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA, G. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STRLIC, M.; RADOVIC, T.; KOLAR, J.; PIHLAR, B. Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6313–6317, 2002.

TABATABAEE AMID, B.; 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. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.042>>. .

TADROS, T. F. **Emulsion Science and Technology**. United Kingdom: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009.

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

USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 145–153, 2014.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473–485, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668913000276>>. .