

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DEPARTAMENTO DE FÍSICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

MONIQUE DE SOUZA

Espectroscopia Fotoacústica no UV-Vis e no IR para avaliação *ex vivo* da difusão na pele de emulsões contendo nanocristais de celulose e saponinas

MARINGÁ 2019

MONIQUE DE SOUZA

Espectroscopia Fotoacústica no UV-Vis e no IR para avaliação *ex vivo* da difusão na pele de emulsões contendo nanocristais de celulose e saponinas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

MARINGÁ 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S729e	Souza, Monique de Espectroscopia fotoacústica no UV-Vis e no IR para avaliação ex vivo da difusão na pele de emulsões contendo nanocristais de celulose e saponinas / Monique de Souza Maringá, PR, 2019. 62 f.: il. color., figs.
	Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2019. 1. Espectroscopia fotoacústica . 2. Permeação cutânea. 3. Emulsão - Nanocristais de celulose - Pele. 4. Emulsão - Saponinas - Pele. I. Baesso, Mauro Luciano, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.
	CDD 23.ed. 535.84

MONIQUE DE SOUZA

Espectroscopia Fotoacústica no UV-Vis e no IR para avaliação *ex vivo* da difusão na pele de emulsões contendo nanocristais de celulose e saponinas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Sandro Márcio Lima Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

> Profa. Dra. Bruna Luíza Pelegrini Universidade Estadual de Maringá

> Profa. Dra. Luzmarina Hernandes Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo "in memorian" e Maria Tereza.

Agradecimentos

Este trabalho só se concretizou graças a importante colaboração de algumas pessoas, que eu não posso deixar de agradecer:

À minha mãe Maria Tereza, ao meu pai Paulo "*in memoriam*" e ao meu irmão Guilherme por sempre me apoiarem e incentivarem a estudar e seguir meus sonhos.

A meu esposo Regis, por todo carinho, compreensão e, sobretudo, pelo incentivo dado nas horas difíceis.

Ao professor Mauro Luciano Baesso, pela orientação, oportunidades e ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado.

À professora Francielle Sato, por sempre esclarecer minhas dúvidas com muita paciência e dedicação.

As amigas que conquistei durante o mestrado, Adriane, Camila, Lidi, Mari e Raquel, por todos os momentos de descontração e pelas importantes discussões compartilhadas. Dentre essas, um agradecimento especial a Lidi, Mari e Raquel, por toda colaboração e dedicação que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Jamais esquecerei!

À Bruna Luíza, pelo fornecimento das emulsões e por sanar minhas dúvidas em relação às mesmas.

Ao CNPq e à FINEP pelo apoio financeiro concedido.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) e à Universidade Estadual de Maringá por toda infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada à todos!

RESUMO

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas é de grande importância tanto em termos de saúde da população como econômicos. As formulações para aplicações tópicas precisam ser avaliadas em termos de sua capacidade de penetração ao longo dos tecidos adjacentes ao alvo que se pretende atingir. Nesse aspecto, técnicas de espectroscopia fotoacústica podem ser utilizadas para detecção e análise do processo de difusão de formulações em tecidos biológicos. O objetivo deste estudo é avaliar ex vivo a difusão na pele de orelhas de suínos de emulsões contendo óleo e saponinas (derivados da Sapindus saponaria L.) e nanocristais de celulose. Os experimentos foram realizados com a espectroscopia fotoacústica nas regiões espectrais do ultravioleta-visível (UV-Vis), no intervalo entre 270 e 600 nm, e do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-PAS), entre 3.725 e 1.000 cm⁻¹. Os resultados mostraram que ambos os métodos evidenciaram que a formulação foi capaz de se propagar através da pele, até uma profundidade de aproximadamente 700 µm. O cálculo dos valores das áreas das bandas de absorção dos componentes das emulsões (nanocristais de celulose, saponinas e óleo) detectados na derme permitiu a realização da estimativa de permeação desses compostos. Observou-se que a emulsão com maior concentração de nanocristais de celulose teve menor taxa de permeação em razão de sua textura mais viscosa. Os resultados mostraram que não houve alterações nas bandas de absorção dos tecidos da pele, sugerindo que as emulsões não apresentaram efeitos adversos nas regiões da pele avaliadas. Em conclusão, esta foi a primeira vez que esses dois métodos de espectroscopia fotoacústica foram combinados para o estudo da difusão de emulsões na pele. Nossas observações sugerem que o procedimento adotado poderá ser ampliado para outros estudos na área de farmacologia, ampliando a possibilidade de se detectar bandas de absorção características das duas regiões espectrais que possam ser adotadas como marcadores de permeação.

ABSTRACT

The development of new pharmaceutical formulations is of great importance in both population health and economic terms. Formulations for topical applications need to be evaluated for their ability to penetrate the tissues adjacent to the intended target. In this regard, Photoacoustic Spectroscopy Techniques have been used to detect and analyze the diffusion process of formulations into biological tissues. The objective of this study is to evaluate ex vivo the diffusion in the skin of swine ears of emulsions containing oil and saponin (derived from Sapindus saponaria L.) and cellulose nanocrystals. The experiments were performed with photoacoustic spectroscopy in the ultraviolet-visible (UV-Vis) spectral regions, between 270 and 600 nm, and Fourier transform infrared (FTIR-PAS), between 3,725 and 1,000 cm⁻¹. The results showed that both techniques showed that the formulations were able to propagate through the skin to a depth of approximately 700 µm. The calculation of the area of the absorption band of the emulsion components (cellulose nanocrystals, saponins and oil) detected in the dermis allowed to perform the estimation of permeation rates of these compounds. It was observed that the emulsion with higher concentration of cellulose nanocrystals had lower permeation rate due to its higher viscous texture. The results showed that there were no changes in the absorption bands of the skin tissues, suggesting that the emulsions had no adverse effects on the evaluated skin regions. In conclusion, this was the first time these two techniques were combined to study emulsions diffusion through skin. Our observations suggest that the adopted procedure could be extended to other studies in the field of pharmacology, expanding the possibility of detecting absorption bands characteristic of the two spectral regions that can be adopted as permeation markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema representativo das camadas da pele [25]14
Figura 2.2. Esquema das principais rotas de permeação de fármacos através da pele. (A)
Via transcelular: penetração através do estrato córneo; (B) Via intercelular: permeação
através de lípidos e espaços inter-celulares e Via transfolicular: Permeação através de
(C) folículo piloso e (D) glândulas sebáceas [25]14
Figura 2.3. Representação esquemática de uma emulsão de água em óleo, à esquerda, e
uma, de óleo em água à direita [31]16
Figura 2.4Esboço de uma emulsão óleo em água com surfactantes e outra com
partículas sólidas [6]
Figura 2.5. Representação esquemática da célula fotoacústica [41]19
Figura 2.6. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do
mecanismo de difusão térmica20
Figura 2.7. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do
mecanismo de expansão térmica21
Figura 2.8. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do
mecanismo de flexão termoelástica21
Figura 2.9. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do mecanismo de efeito fotobárico
Figura 2.10. Representação do comportamento óptico de um material [44]23
Figura 2.11. Esquema representativo do perfil de profundidade na geração do sinal
fotoacústico
Figura 2.12. Diagrama de nível de energia molecular que descreve três estados
eletrônicos [49]
Figura 2.13. Exemplos de modos de vibrações: (a-b) deformações axiais (estiramentos)
e (c-f) deformações angulares. Sendo "x" movimento para dentro do plano e "•"
movimento para fora do plano. Adaptado [52]
Figura 3.1. Fotografia dos flaconetes contendo as emulsões utilizadas neste estudo para
rigura 5.1. Potograna dos naconetes contendo as endisoes utilizadas neste estudo para

Figura 3.1. Fotografia dos flaconetes contendo as emulsões utilizadas neste estudo para a avaliação da permeação cutânea. (A) Emulsão 01; (B) Emulsão 02; (C) Emulsão 03 e (D) Emulsão 04.
Gigura 3.2. Fotografias de amostras de orelhas de suínos. Em (A) após a coleta da orelha do animal. Em (B) durante a dissecção para remoção da cartilagem e gordura subcutânea e obtenção da pele. Em (C) a vista da superfície da epiderme e da (D) derme, após processo de dissecção. Em (E) amostras recortadas das orelhas para a análise com os métodos FTIR-PAS (10 mm) e PAS UV-Vis (5 mm).
Figura 3.3. Em (A) fotografia da uma amostra de epiderme de orelha de suíno após a aplicação da emulsão. Em (B) Representação esquemática do processo da aplicação da emulsão e aquisição dos espectros de absorção.
Figura 3.4. Representação lateral da célula fotoacústica para a região UV-Vis [14].
34
Figura 3.7. Esquema representativo da espectroscopia fotoacústica no infravermelho por transformada de Fourier. Adaptado [47].

Figura 4.	1.	Comprimentos	de	difusão	térmica	da	amostra	de	pele	para	PAS	UV-Vis e
FTIR-PAS.												37

Figura 4.2. Esquema representativo da profundidade monitorada no experimento. (A) PAS UV-Vis com incidência de luz na epiderme (lado esquerdo) ou na derme (lado direito) e (B) FTIR-PAS com incidência de luz na epiderme (lado esquerdo) ou na derme
(lado direito)
Figura 4.3. Espectros de absorção óptica das emulsões e seus componentes
Figura 4.4. Espectros de absorção óptica das emulsões ajustados com curvas
gaussianas. (A) Emulsão01 (0%N+5%S): (B) Emulsão02 (0.5%NC+5%S): (C) Emulsão03
(5%NC+8%S): (D) Emulsão04 (10%NC+6.5%S)
Figura 4.5. Espectros de absorção óptica da derme e epiderme controle da orelha de
suínos
Figura 4.6. Espectros de absorção óptica da epiderme controle e epiderme uma hora
após a aplicação da emulsão41
Figura 4.7. Espectros de absorção óptica da derme controle e da derme uma hora após a
aplicação da emulsão na epiderme da orelha de suínos42
Figura 4.8. Ajuste gaussiano do espectro de absorção óptica da derme controle da
orelha de suínos
Figura 4.9. Espectros de absorção óptica (ajustados com curvas gaussianas) da derme
uma hora após a aplicação de emulsão na epiderme da orelha de suínos. (A) Emulsão01
(0%N+5%S); (B) Emulsão02 (0,5%NC+5%S); (C) Emulsão03 (5%NC+8%S); (D)
Emulsão04 (10%NC+6,5%S)
Figura 4.10. Área das gaussianas centradas em 313, 361 e 452 nm referentes aos
nanocristais de celulose, as saponinas e o óleo, respectivamente45
Figura 4.11. Espectros de absorção óptica no infravermelho (A) das emulsões e (B) de
seus componentes, saponinas, nanocristais de celulose suspensos em água e óleo47
Figura 4.12. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme e epiderme
controle da orelha de suínos
Figura 4.13. Espectros absorção óptica no infravermelho da epiderme controle e da
epiderme uma hora após da aplicação de emulsão
Figura 4.14. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme controle em
comparação a derme uma hora após a aplicação da emulsão na epiderme da orelha de
suíno, com destaque para as regiões onde ficaram mais evidente a diferença entre elas.
(A) Emulsão01 $(0\%N+5\%S)$; (B) Emulsão02 $(0.5\%NC+5\%S)$; (C) Emulsão03
(5%NC+8%S); (D) Emulsão04 (10%NC+6,5%S)
Figura 4.15. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme controle e da
derme com aplicação da emulsão na derme da orelha de suínos
Figura 4.16. Área obtida pelo cálculo da integral nas regiões: 3.019 – 2.836. 1.782 –
1.730 e 1.180 – 1.140 cm ⁻¹ dos espectros de absorcão óptica no infravermelho da derme
controle e da derme com aplicação da emulsão na epiderme
I J I I I I I I I I I I I I I I I I I I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
	1.1 Objetivos	
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
	2.1. Pele	
	2.1.1 Estrutura da pele	
	2.1.2 Rotas de permeação de substâncias através da pele	
	2.2 Emulsões	
	2.3 Espectroscopia Fotoacústica	
	2.3.1 Mecanismos de geração do sinal fotoacústico	
	2.3.2 Comportamento óptico e térmico das amostras	
	2.4 Espectroscopia Fotoacústica no ultravioleta e visível	
	2.5 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho	
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	3.1 Preparação das amostras	
	3.1.1 Emulsões	
	3.1.2 Amostras de pele	
	3.2 Espectroscopia Fotoacústica para região UV-Vis	
	3.3 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada	de Fourier34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
	4.1 Comprimento de difusão térmica	
	4.2 PAS UV-Vis	
	4.2.1 Espectros de absorção óptica das Emulsões	
	4.2.2 Medidas de permeação na pele	
	4.3 FTIR – PAS	
	4.3.1 Espectros de absorção óptica das Emulsões no IR	
	4.3.2 Análise de permeação na pele	
5	CONCLUSÃO	54

6 REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas é uma área de grande importância tanto em termos de saúde da população como econômicos. Os sistemas emulsionados são de interesse da indústria farmacêutica porque apresentam alta capacidade de penetração na pele, podendo ser utilizados como veículos na liberação controlada de fármacos [1, 2, 3]. Emulsões são compostas basicamente por uma fase aquosa e outra oleosa e para que apresente estabilidade, isto é, para que possa ser armazenada por um longo período de tempo, sem sofrer alterações sob certas circunstâncias, é necessário acrescentar a esse sistema um surfactante e/ou partículas sólidas [4].

A Sapindus saponaria L. (Sapindaceae) é uma árvore encontrada em diversas regiões do Brasil. A espécie é usada tanto em paisagismo quanto para a extração de saponinas e óleos de seus frutos, que são empregados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios [5,6]. O óleo extraído da semente de Sapindus saponaria L. tem potencial para ser usado como fase oleosa de uma emulsão e as saponinas extraídas do pericarpo são surfactantes naturais. As partículas sólidas, que também tem a função de estabilizar uma emulsão, podem ser nanocristais de celulose, pois são biodegradáveis, biocompatíveis e ainda são de fácil obtenção e baixo custo. Portanto, com a combinação de óleo e saponinas extraídos da Sapindus saponaria L. e nanocristais de celulose, é possível obter formas farmacêuticas estáveis e ecologicamente viáveis que podem ser utilizadas como possíveis veículos para difusão de fármacos através de tecidos biológicos [6].

Para medicamentos de uso tópico é fundamental obter informações sobre possíveis interações da substância com o tecido biológico, além dos mecanismos envolvidos durante a penetração ao longo dos corpos adjacentes ao alvo que se pretende atingir. Técnicas espectroscópicas além de fornecer essas informações, permitem determinar as propriedades e a composição das substâncias, viabilizando avaliação da qualidade e conformidade do produto final [7, 8].

Estudos usando métodos espectroscópicos já foram empregados na análise de diversos sistemas biológicos [9, 10, 11, 12, 13]. Dentre esses, destacamos a espectroscopia Fotoacústica (PAS) como uma ferramenta que tem se mostrado muito efetiva na determinação da difusão de substâncias em tecidos biológicos *in* *vivo*, *ex-vivo* ou *in vitro* [14, 15, 16]. A técnica possui como vantagem a possibilidade de identificação de substâncias em diversas espessuras da amostra, fornecendo um perfil de profundidade de sua propagação, além de necessitar de mínima preparação da amostra e não provocar a degradação da mesma [17, 18].

A espectroscopia fotoacústica é uma técnica utilizada para medir a radiação absorvida por uma amostra. Por meio dela pode-se correlacionar os processos de absorção com a estrutura química e a funcionalidade do material analisado. Ela pode ser realizada em diferentes regiões do espectro. Nas faixas espectrais do ultravioleta e do visível (UV-Vis) a absorção da radiação por um dado material é majoritariamente decorrente de processos envolvendo transições eletrônicas e de transferência de carga, enquanto que na absorção do infravermelho (IR), prevalecem as transições vibracionais e as rotacionais das moléculas [19].

A combinação de procedimentos de medida utilizando as regiões espectrais do UV-Vis e do IR é vantajosa porque permite avaliar simultaneamente a penetração e a interação das formulações com os tecidos. As bandas espectrais das substâncias podem ser adotadas como marcadores, de modo que ao serem detectadas em uma determinada profundidade do tecido revelam se houve ou não a penetração da formulação. Por outro lado, as bandas no IR, para além da determinação da permeação, podem ainda fornecer informações sobre as interações entre o tecido e a formulação, permitindo a realização de análise físico-química dos compostos e tecidos envolvidos no processo [9, 18].

Portanto, parece oportuna a utilização da técnica fotoacústica para as regiões espectrais do ultravioleta e do visível (PAS UV-Vis) e do infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR-PAS) para se avaliar a difusão na pele de fórmulas farmacêuticas de interesse para a população. Até onde sabemos, esta seria a primeira vez que esses dois métodos de espectroscopia fotoacústica serão combinados para a análise do processo de permeação em pele. Em especial, considerando o potencial de aplicação das formulações a serem testadas, conforme demonstrado em estudos anteriores [6, 20], torna-se oportuna a avaliação da taxa de difusão na pele de emulsões desenvolvidas a partir de compostos extraídos dos frutos da *Sapindus saponaria L.* e de nanocristais de celulose.

1.1 Objetivos

O objetivo principal desta dissertação é avaliar a difusão cutânea por meio da espectroscopia fotoacústica no ultravioleta e visível e no infravermelho por transformada de Fourier de formas farmacêuticas emulsionadas contendo óleo e saponinas extraídas de *Sapindus saponaria L.* e nanocristais de celulose.

Objetivos específicos:

- Aplicar os métodos PAS UV-Vis e FTIR-PAS para análise da permeação de emulsões na pele da orelha de suínos;
- Determinar e caracterizar as respostas espectrais das emulsões e de seus componentes visando identificar marcadores para análise da permeação na pele;
- Analisar a difusão na pele de suínos de emulsões contendo saponinas (derivada da Sapindus saponaria L.) e nanocristais de celulose.
- Verificar qual a melhor relação nanocristais de celulose e saponinas para o processo de difusão na pele.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pele

2.1.1 Estrutura da pele

A pele representa aproximadamente 15% do corpo humano de um adulto e desempenha funções de proteção contra agressores físicos, químicos e biológicos, além de ser a interface de termorregulação e controle de perda de água [21].

Ela é composta por aproximadamente 70% de água e o restante são substâncias como aminoácidos, proteínas (elastina, colágeno, melanina) e azotados (ácidos graxos e ureia). Outros elementos importantes são os lipídios e os sais minerais [22].

A estrutura da pele é formada por várias camadas com funções específicas no organismo, às duas principais são a epiderme e a derme, que se subdividem em outras camadas. O estrato córneo, pertencente à epiderme, é a camada mais superficial, que para os seres humanos adultos possui espessura variável entre aproximadamente 10 e 20 µm sendo a primeira barreira de proteção e definição das condições para absorção percutânea de fármacos. A epiderme apresenta entre 50 a 100 µm de espessura, é um tecido avascular formado por várias camadas de células sobrepostas, os queratinócitos, que sintetizam a queratina. Logo em seguida encontra-se a derme, que apresenta entre 1 a 2 mm de espessura. É um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e elastinas que oferecem forca e volume, dando resistência e elasticidade à pele. Encontram-se neste tecido, glândulas sebáceas e sudoríparas, fibras, vasos sanguíneos, nervos e receptores de sensibilidade. Sendo importante ressaltar a grande quantidade de vasos sanguíneos existentes nesta camada da pele, pois os mesmos podem interferir no processo de permeação de uma substância. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, tecido rico em colágeno e gordura, não faz parte da pele, mas serve como suporte para ela [23, 24] (Figura 2.1).



Figura 2.1. Esquema representativo das camadas da pele [25].

2.1.2 Rotas de permeação de substâncias através da pele

A pele humana age como uma barreira natural protegendo o corpo contra a penetração de partículas, microorganismos e outras substâncias. O estrato córneo é a maior barreira para permeação de substancias químicas aplicadas topicamente. Ele controla o primeiro estágio da possível penetração de agentes através da pele [24]. A permeação cutânea pode ocorrer por três rotas principais, conforme ilustrado na Figura 2.2.



Figura 2.2. Esquema das principais rotas de permeação de fármacos através da pele. (A) Via transcelular: penetração através do estrato córneo; (B) Via intercelular: permeação através de lípidos e espaços inter-celulares e Via transfolicular: Permeação através de (C) folículo piloso e (D) glândulas sebáceas [25].

A via transcelular esta relacionada à penetração através do estrato córneo. A estrutura do estrato córneo é formada de corneocitos de queratina hidratada e camadas lipídicas. A maioria das moléculas presentes nos fármacos penetra através da pele por meio dessa rota. Na via intercelular as moléculas permeiam por meio da matriz extracelular, sem atravessar as células. A via transfolicular é uma rota de permeação via folículos pilosos, glândulas sebáceas e dutos de suor [26, 27].

A difusão de fármacos através da pele envolve vários passos. O fármaco aplicado topicamente se difunde através do estrato córneo e a seguir através da epiderme até atingir a derme. Diversos fatores podem influenciar na permeação, como a concentração da formulação, suas características físico-químicas, e a integridade da pele [27].

2.2 Emulsões

O uso de emulsões é explorado para diversas aplicações industriais: farmacêutica, cosmética e alimentar. Na indústria alimentícia, por exemplo, muitos produtos, como bebidas, sopas, sobremesas, e cremes, são sistemas formados à base de emulsões, que necessitam de emulsificantes para que ocorra a formação e estabilização dos mesmos [28, 29].

As emulsões são compostas por duas fases líquidas que não se misturam, como água e óleo. Uma emulsão pode ser do tipo água em óleo, quando a porção oleosa é maior que a aquosa, ou do tipo óleo em água, quando a porção aquosa é maior que a oleosa (Figura 2.3). A agitação constante desses líquidos provoca a geração de gotículas de um dos líquidos disperso no interior do outro, formando uma mistura heterogênea. Dessa forma, a área interfacial é aumentada, ocasionado uma tensão interfacial e modificando sua estabilidade [30, 31, 6]. Sistemas emulsionados são termodinamicamente instáveis, com o decorrer do tempo podem sofrer alterações devido a fatores de instabilidade, como, desnatação, floculação, coalescência e separação de fase [29]. Assim, para que as emulsões se tornem estáveis e macroscopicamente homogêneas é necessário a adição de emulsificantes. [32, 6].



Figura 2.3. Representação esquemática de uma emulsão água em óleo, à esquerda, e uma, óleo em água à direita [31].

Existem diversas substâncias que podem ser utilizadas como emulsificantes, como os surfactantes e as partículas sólidas. Os surfactantes têm a característica de adsorção rápida na interface, sendo eficientes na diminuição da tensão interfacial entre a água e o óleo e facilitando o rompimento de gotas durante o processo de homogeneização. As partículas sólidas são absorvidas na superfície interfacial estruturando um filme denso entre os líquidos, criando uma barreira cinética contra a coalescência das gotículas (Figura 2.4) [6].

Microemulsões são misturas macroscopicamente homogêneas de três componentes principais: a água, o óleo e o emulsificante. São sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, de baixa viscosidade e opticamente transparentes. Mesmo aparentando homogeneidade, esses sistemas são compostos por pequenas partículas dispersas [33, 34]. Quando estabilizadas por partículas sólidas, sistema conhecido como emulsões Pickering, estas devem ser de tamanhos nanométricos que proporcionam o equilíbrio de gotas menores de alguns micrometros de diâmetro. Ou seja, as partículas utilizadas para a estabilização do sistema devem ser menores que as gotas da emulsão. É relatado na literatura que o excesso de sólidos ajuda na estabilidade da emulsão, pois ocorre o aumento da viscosidade da mesma, que pode então desacelerar o processo de coagulação e coalescência [35]. Pode-se dizer então que a estabilização das microemulsões depende da concentração e das dimensões das partículas.



Figura 2. 4.-Esboço de uma emulsão óleo em água com surfactantes e outra com partículas sólidas [6].

Devido ao uso de emulsões em produtos alimentícios e farmacêuticos, surgiu a necessidade de se substituir os emulsificantes sintéticos por aqueles obtidos a partir de produtos naturais. Nesta linha de investigação, procura-se emulsificantes que apresentem propriedades estabilizadoras e que possam manter a dispersão de um líquido em outro, já que quando utilizados, precisam proporcionar as emulsões vida útil longa e resistência à fatores ambientais [29, 36]. Deste modo, o desenvolvimento de combinações de emulsificantes utilizando misturas com surfactantes naturais bem como a adição de partículas sólidas, tem como meta principal o aperfeiçoamento da estabilidade das emulsões [37, 38].

Os nanocristais de celulose são partículas sólidas interessantes para o uso em estabilizações de emulsões por serem de origem renovável, biodegradável, de baixo custo, com grande abundância na natureza e apresentam excelentes propriedades mecânicas. Os mesmos podem ser obtidos de diferentes materiais, incluindo pedaço de papel, madeira, celulose bacteriana, entre outros [39]. A associação de nanocristais e surfactantes melhora a compatibilidade da celulose com sistemas farmacêuticos, além de permitir a liberação de ativos oleosos situados no interior das micelas [39, 6]. Kargar [37], por exemplo, investigou a capacidade de partículas como amido modificado e celulose microcristalina para melhorar a estabilidade de emulsões e reduzir a oxidação lipídica. Marku *et al.* [1] argumenta que emulsões podem ser interessantes para serem usadas como veículos na liberação controlada de fármacos. Os autores desenvolveram emulsões estabilizadas por amido e tiveram como resultado um aumento na difusão cutânea.

A espécie Sapindus saponaria L. (Sapindaceae) encontra-se em diversas regiões brasileiras, seus frutos têm sido usados na produção de sabão e no combate

a algumas doenças. De seu pericarpo é possível extrair saponinas e de suas sementes o óleo. Esses componentes tem grande potencial para serem usados em emulsões. As saponinas, por exemplo, podem ser utilizadas como surfactantes naturais, substituindo assim surfactantes sintéticos derivados de petróleo e com a vantagem de terem alta disponibilidade e serem biodegradáveis [5, 6]. Nesse cenário, desenvolveu-se as emulsões estudadas neste trabalho, obtidas a partir da combinação de óleo e saponinas derivados da espécie *Sapindus saponaria L.* e os nanocristais de celulose [6, 20].

2.3 Espectroscopia Fotoacústica

Técnicas espectroscópicas são utilizadas para estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A interação da luz com cada molécula orgânica ou inorgânica resulta em diversos fenômenos físicos, como absorção, reflexão, transmissão, luminescência, entre outros. Cada efeito pode ser estudado por uma técnica espectroscópica diferente. No caso da espectroscopia fotoacústica, técnica adotada neste trabalho, o princípio fundamental de seu funcionamento é a absorção da luz pela matéria seguida de geração de calor.

O efeito fotoacústico foi descoberto por Alexandre Graham Bell em 1880, quando observou a produção de efeitos sonoros como consequência da incidência intermitente da luz solar em um sólido [40]. Após essa descoberta, ele estudou o efeito fotoacústico em líquidos e gases, concluindo que sinal fotoacústico dependia do tipo de substância e, sua intensidade, da quantidade de luz que o material absorvia [41]. No entanto, o modelo teórico e experimental que descreve o fenômeno fotoacústico para sólidos só foi desenvolvido quase um século depois, por Rosencwaig e Gersho [42]. Isso possibilitou o nascimento da área de fotoacústica, viabilizando sua aplicação para o estudo de diversos materiais, incluindo os sistemas biológicos [43]. Uma das grandes vantagens da técnica é a detecção de substâncias ao longo da espessura de uma amostra, permitindo estudos do perfil de profundidade da absorção óptica do material [18].

O efeito fotoacústico acontece quando um feixe de luz modulado incide em uma amostra. A amostra deve estar dentro de uma câmara fechada, denominada célula fotoacústica, preenchida com um gás. Um microfone é acoplado ao corpo da célula para detecção da variação de pressão induzida pela absorção da luz incidente [42]. O uso de gás He como meio transdutor no interior da célula fotoacústica permite amplificar a intensidade do sinal [9].

A célula fotoacústica proposta por Rosencwaig e Gersho [42], conhecida como célula de RG, consiste em uma célula em formato cilíndrico contendo gás, com a amostra posicionada em seu interior de maneira que sua superfície frontal fique exposta ao gás e sua outra superfície em contanto com o porta amostra, que deve ser de um material bom condutor, por exemplo, um suporte metálico. Na parede lateral da célula é colocado um microfone que capta o sinal fotoacústico. Para vedar a célula fotoacústica é colocada uma janela óptica, de material transparente na região espectral escolhida. A configuração da célula fotoacústica está representada na Figura 2.5. Os símbolos presentes na figura são definidos como: l_g , espessura do gás; l_s , espessura da amostra; l_b , espessura do suporte. [41].



Figura 2.5. Representação esquemática da célula fotoacústica [41].

A absorção da luz modulada pela amostra gera seu aquecimento de forma periódica, que, por sua vez, provoca uma variação na pressão do gás dentro da célula fotoacústica. Essa variação é detectada pelo microfone e o sinal obtido é sintonizado por um amplificador, *Lock-in,* resultando no sinal fotoacústico. Quando se utiliza diferentes comprimentos de onda para excitação, o sinal fotoacústico fornece o espectro de absorção óptica da amostra. A magnitude do sinal depende da quantidade de luz absorvida pelo sólido. [14, 42].

2.3.1 Mecanismos de geração do sinal fotoacústico

O sinal fotoacústico surge devido ao movimento periódico do gás circundante na amostra [42]. Atualmente, sabe-se que os principais mecanismos envolvidos nesse processo são: difusão térmica do calor da amostra para o gás, expansão térmica da amostra, flexão termoelátisca da amostra e efeito fotobárico gerado na amostra [41, 44].

No mecanismo de difusão térmica, ao incidir luz modulada em uma amostra com consequente absorção e geração de calor, por meio do processo de condução, a energia térmica é difundida para o restante do material, aquecendo também o gás que a circunda. Uma vez que a amostra é excitada periodicamente, a camada de gás em contato com sua superfície responde termicamente a essa flutuação de temperatura, expandindo e contraindo, funcionando como um pistão vibratório na coluna de gás. A variação da pressão do gás resulta então no sinal fotoacústico [14, 42, 44]. Esse processo é ilustrado na Figura 2.6.



Figura 2.6. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do mecanismo de difusão térmica.

No mecanismo de expansão térmica, o aquecimento periódico da amostra, induzido pela incidência da luz modulada, irá provocar sua expansão e contração, por inteiro, gerando vibrações mecânicas no gás circundante a mesma. O sinal fotoacústico é gerado pelas ondas acústicas detectadas pelo microfone. Este mecanismo ocorre quando a amostra é composta de um material com alto coeficiente de expansão térmica [14, 44] (Figura 2.7).



Figura 2.7. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do mecanismo de expansão térmica.

O mecanismo de flexão termoelástica ocorre principalmente quando a amostra tem suas extremidades fixas. A incidência da luz modulada provoca um gradiente de temperatura ao longo de sua espessura. Esse gradiente produz uma dilatação térmica distinta para cada plano da amostra (perpendicular ao gradiente). Como a luz incidente é modulada, esse efeito de flexão ocorre de forma periódica, resultando na vibração do gás e, consequentemente, no sinal fotoacústico [14, 44] (Figura 2.8).



Figura 2.8. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do mecanismo de flexão termoelástica.

O último mecanismo conhecido é o efeito fotobárico. Este pode ocorrer quando a amostra é fotoquimicamente ativa, com troca gasosa entre a amostra e o gás presente no interior da célula fotoacústica. Um exemplo desse efeito acontece no processo de fotossíntese, no qual há liberação de oxigênio no interior da cálula, aumentando a pressão interna, e consequentemente variando o sinal fotoacústico. [14, 44, 45] (Figura 2.9).



Figura 2.9. Representação esquemática da geração do sinal fotoacústico por meio do mecanismo de efeito fotobárico.

Estes mecanismos de geração do sinal fotoacústico podem ocorrer individualmente ou de forma simultânea.

2.3.2 Comportamento óptico e térmico das amostras

O comportamento da propagação da luz em uma amostra não opaca pode ser descrito pela Lei de Beer, que fornece a intensidade da luz, I(x), em função da profundidade *x* dentro da amostra [46]:

$$I(x) = I_0 e^{[-\beta(x-x_0)]}$$
(1)

Na equação, $\beta(\lambda)$ é o coeficiente de absorção óptica do material e seu valor é inversamente proporcional ao comprimento de absorção óptica, l_{β} , conforme mostra a equação (2). O comprimento de absorção óptica é definido com sendo a distância de propagação da luz até que sua intensidade seja reduzida a 1/e do valor de I_0 [42].

$$l_{\beta} = \frac{1}{\beta} \tag{2}$$

O comportamento óptico de uma amostra pode ser determinado considerando-se três situações: opaca, absorvedora ou transparente. A Figura 2.10 demonstra como é o comportamento óptico de um material considerando o parâmetro l_{β} e a espessura total da amostra, l.

- Amostra opticamente opaca: $l_{\beta} \ll l$.
- Amostra absorvedora: $l_{\beta} = l$
- Amostra opticamente transparente: $l_{\beta} \gg l$



Figura 2.10. Representação do comportamento óptico de um material [44]

Da mesma maneira que uma amostra pode ser caracterizada por seu comportamento óptico, ela também pode ser caracterizada por seu comportamento térmico. A caracterização do comportamento térmico de uma amostra está relacionada com o comprimento de difusão térmica, μ_s .

Como exposto anteriormente, no processo de difusão térmica a radiação eletromagnética é absorvida pela amostra gerando calor que é difundido para outras partes da mesma. No entanto, apenas uma camada, a uma determinada profundidade da amostra contribui para a geração do sinal fotoacústico. A espessura da amostra onde o calor gerado contribui para a geração do sinal fotoacústico, é definida como comprimento de difusão térmica; sua expressão depende da forma como o experimento é realizado. No caso de medidas com modulação e detecção convencional, é:

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D}{\pi f}} \tag{3}$$

Ou seja, o valor de μ_s depende da frequência de modulação da luz, f, e da difusividade térmica da amostra, D, sendo seu valor um parâmetro constante para cada tipo de material.

Entretanto, quando o experimento é realizado em espectrômetros com interferômetro de Michelson, com o processamento do sinal via Transformada de Fourier, a expressão para o cálculo do comprimento de difusão térmica depende da velocidade do espelho do interferômetro. No caso para a operação via modo *rapid scan*, [47] a expressão é:

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D\lambda}{2\pi f}} \tag{4}$$

Classifica-se o comportamento térmico da amostra comparando sua espessura total, l_s , com o comprimento de difusão témica μ_s :

- Amostra termicamente grossa: $l_s \gg \mu_s$.
- Amostra termicamente fina: $l_s \ll \mu_s$

Como o comprimento de difusão térmica é função da modulação, alterando a frequência altera-se a profundidade no material onde o sinal é gerado. Deste modo, é possível analisar diferentes camadas da amostra, ou seja, realizar um perfil de profundidade no material. Como os dois parâmetros são inversamente proporcionais, quanto maior a frequência de modulação mais superficial será a camada que contribui para a geração do sinal fotoacústico (Figura 2.11).



Figura 2. 11. Esquema representativo do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico.

Além desses fatores que governam o sinal fotoacústico, como coeficiente de absorção, difusão de calor e profundidade na amostra onde o calor é gerado, o sinal também depende das dimensões da coluna de gás entre a amostra e a janela óptica. E sua intensidade depende ainda da potência da fonte de radiação eletromagnética [41].

O sinal fotoacústico é composto por uma amplitude e uma fase. A fase é um parâmetro físico que esta relacionado com tempo de relaxação térmica da amostra, sendo independente da potência de iluminação. Ela permite obter informações sobre os processos de relaxação envolvidos na geração do sinal fotoacústico. [41].

Esses recursos da espectroscopia fotoacústica (perfil de profundidade, fase, etc) juntamente com seu caráter não invasivo, fornecem à técnica potencial para o estudos *in vivo*, um potencial que pode ter implicações importantes em pesquisas e diagnósticos na área da medicina [42,16].

2.4 Espectroscopia Fotoacústica no ultravioleta e visível

A quantidade de energia que um feixe de luz possui pode ser definida pela equação de Planck, escrita em termos do comprimento de onda (5). Pode-se perceber por meio da equação que comprimento de onda e energia são inversamente proporcionais, isto é, quanto maior o comprimento de onda, menor será a energia. Os fenômenos espectroscópicos dependem da ordem de grandeza da energia da radiação eletromagnética, sendo que a mesma pode ser descrita em termos do comprimento de onda. Assim, quando a luz incide sobre a matéria ela pode causar transições entre níveis de energia. Conforme o valor da energia, as transições podem ser divididas em eletrônicas, vibracionais, rotacionais e translacionais [48].

$$E = \frac{hc}{\lambda} \tag{5}$$

A região espectral do ultravioleta abrange o intervalo espectral de aproximadamente 180 a 380 nm e a do visível de 380 a 750 nm. Essas regiões compreendem processos de absorção que essencialmente são governados por

mecanismos de transição eletrônica entre os níveis de energia de um mesmo átomo ou molécula e/ou por processos de transferência de carga. Uma transição eletrônica ocorre quando um elétron muda de orbital, como ao absorver ou emitir um fóton de energia, alterando assim seu nível de energia. As moléculas possuem níveis específicos de energia permitidos. Quando uma molécula absorve a luz, o elétron passa de um estado de menor energia para um estado excitado, maior energia. Geralmente o estado de menor energia é o estado fundamental (Figura 2.12) [49].



Figura 2. 12. Diagrama de nível de energia molecular que descreve três estados eletrônicos [49].

Em geral, bandas de absorção na região do UV-Vis são largas e muito intensas. Outro aspecto é que, em sistemas biológicos, como as moléculas podem ser formadas por estruturas longas, os mecanismos de relaxação térmica não são dissipação de toda absorvida, suficientes para permitir а а energia consequentemente, pode ocorrer alta intensidade de luminescência [49]. É típico dessa região espectral que as bandas estejam misturadas e na maioria das vezes não é possível se associar uma dada banda a um único grupo funcional ou molécula. Desta forma, o uso de amostras controle é essencial para se evitar interpretação equivocada do espectro de um tecido biológico submetido a modificações.

2.5 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho

A região espectral do infravermelho abrange um amplo intervalo de números de onda, sendo subdivida em outras três sub-regiões: Infravermelho distante (200 a 10 cm⁻¹), infravermelho médio (4.000 a 200 cm⁻¹) e infravermelho próximo (4.000 a 12.800 cm⁻¹). Aqui como normalmente se faz na literatura, adotamos a nomenclatura de número de onda, expressa em cm⁻¹, em vez de comprimento de onda, devido ao fato dessa unidade ser diretamente proporcional à energia. A espectroscopia no infravermelho baseia-se nas alterações induzidas por radiação eletromagnética dos estados vibracionais e rotacionais das moléculas [50].

A região do infravermelho médio está associada com transições vibracionais das moléculas, as quais, ao absorverem a radiação, deixam seus estados fundamentais e são excitadas para níveis vibracionais superiores [50]. Neste processo de absorção, as moléculas apenas absorvem frequências de radiação que equivalem a sua própria frequência natural de vibração, ou seja, a absorção por parte da molécula está diretamente ligada a variação periódica do seu momento dipolar elétrico [19].

Cada molécula apresenta sua própria frequência natural de vibração, a qual pode ser relacionada com o movimento dos seus átomos e ligações presentes [19]. Os modos normais de vibração podem ser divididos em deformações axiais (estiramentos) e deformações angulares. Os possíveis estiramentos e deformações estão ilustrados na [51] Figura 2.13.



Figura 2.13. Exemplos de modos de vibrações: (a-b) deformações axiais (estiramentos) e (c-f) deformações angulares. Sendo "x" movimento para dentro do plano e "•" movimento para fora do plano. Adaptado [52].

Os estiramentos são caracterizados por mudanças nas distâncias entre os átomos, enquanto que, as deformações são causadas por pequenas variações nos ângulos de ligação. Desta maneira, a espectroscopia no infravermelho permite caracterizar grupos funcionais por meio dos espectros, já que, cada grupo apresenta suas vibrações características indicadas por bandas e picos de absorção [53].

Ao contrário do que ocorre nas regiões espectrais do UV-Vis, no infravermelho as bandas podem estar bem definidas de modo que se possa realizar identificação das moléculas. No caso da difusão de formas farmacêuticas, em princípio pode-se avaliar a permeação de cada um de seus componentes ou mesmo alterações no tecido avaliado, eventualmente induzidas pela formulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação das amostras

Este estudo foi realizado em parceria com o Laboratório de Fitoquímica e Inovação Tecnológica (LAFITEC) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá. A forma farmacêutica emulsão contendo nanocristais de celulose e saponinas em diferentes concentrações foram elaboradas e cedidas pelas professoras Dr^a Bruna Luíza Pelegrini e Dr^a Marli Miriam de Souza Lima [6, 20].

3.1.1 Emulsões

Para a elaboração das emulsões foram adicionadas aproximadamente 70% em peso de água, suspensão de nanocristais de celulose (NC) e saponinas (S) obtidas da planta *Sapindus saponaria L.* em flaconetes de vidro com tampa de rosca. A seguir a solução foi submetida à agitação constante a 60 rpm em *roller mixer* (Stuart SRT9D) até sua solubilização. Em seguida, foi acrescentado aproximadamente 30% em peso de óleo de *Sapindus saponaria* L.. A mistura foi emulsificada em um sonificador de alta intensidade (Bioblock Scientific, VibraCell 75115, série Autotune, modelo 750 watts). A duração da agitação foi de 5 minutos, com ciclos de 5 segundos e interrupções de 3 segundos entre eles, em temperatura ambiente [20].

Para a avaliação da permeação, quatro fórmulas da emulsão com diferentes concentrações de nanocristais de celulose e saponinas foram preparadas, contendo aproximadamente (Figura 3.1):

- Emulsão 01: 0% de nanocristais de celulose e 5% de saponinas.
- Emulsão 02: 0,5% de nanocristais de celulose e 5% de saponinas.
- Emulsão 03: 5% de nanocristais de celulose e 8% de saponinas.
- Emulsão 04: 10% de nanocristais de celulose e 6,5% de saponinas.



Figura 3.1. Fotografia do flaconetes contendo as emulsões utilizadas neste estudo para a avaliação da permeação cutânea. (A) Emulsão 01; (B) Emulsão 02; (C) Emulsão 03 e (D) Emulsão 04.

3.1.2 Amostras de pele

O procedimento experimental foi realizado utilizando amostras de orelhas de suínos, brancos, jovens e recém abatidos doadas pelo abatedouro da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá (autorizada pelo Ministério da Agricultura do Brasil para consumo humano). Após a morte dos animais, suas orelhas foram removidas e limpas com água ultrapura, somente foram utilizadas amostras íntegras, sem hematomas ou feridas. Em seguida, estas foram acondicionadas em gelo e trazidas para o laboratório de espectroscopia fotoacústica. O experimento foi realizado uma semana após a aquisição das orelhas e durante este período ficaram preservadas em um congelador. As orelhas foram dissecadas para a remoção da cartilagem e da gordura subcutânea. Para a análise com os métodos PAS UV-Vis e FTIR-PAS, as amostras foram recortadas com aproximadamente 5 ou 10 mm de diâmetro, respectivamente para cada método, e com espessuras variando entre 700 a 800 µm. A espessura das amostras foi medida com o auxílio de um micrômetro digital. Com estas dimensões as amostras preencheram os porta amostras da célula fotoacústica garantindo uma melhor relação sinal/ruído, visto que na espectroscopia fotoacústica a camada de ar pode influenciar na amplitude do sinal gerado (Figura 3.2).



Figura 3. 2. Fotografias de amostras de orelhas de suínos. Em (A) após a coleta da orelha do animal.
Em (B) durante a dissecção para remoção da cartilagem e gordura subcutânea e obtenção da pele.
Em (C) a vista da superfície da epiderme e em (D) da derme, após processo de dissecção. Em (E) amostras recortadas das orelhas para as análises FTIR-PAS (10 mm) e PAS UV-Vis (5 mm).

A seguir foram obtidos os espectros de absorção óptica de amostras da pele sem aplicação da emulsão (controle). As leituras foram realizadas na superfície da epiderme e da derme. Para cada uma foram realizadas medidas em três amostras diferentes.

Para a análise da permeação cutânea foi simulado o processo de aplicação tópica. Inicialmente foram aplicados 5 e 30 µl de emulsão na superfície da pele (epiderme) para as medidas PAS UV-Vis e FTIR-PAS, respectivamente. A emulsão foi espalhada com o auxílio de uma espátula, permanecendo sobre a amostra durante o intervalo de tempo de uma hora. Após esse período, o excesso foi removido com o auxílio de algodão. As medidas foram feitas a partir da iluminação na superfície da epiderme e também na derme, invertendo-se a amostra no interior da célula fotoacústica, conforme mostrado na Figura 3.3.



Figura 3. 3. Em (A) fotografia da uma amostra de epiderme de orelha de suíno após a aplicação da emulsão. Em (B) Representação esquemática do processo da aplicação da emulsão e aquisição dos espectros de absorção.

Foram medidas três amostras diferentes de epiderme e de derme para cada emulsão e a partir dos espectros obtidos (n=3) foi realizado uma média.

Adquiriu-se ainda, os espectros de cada emulsão e seus componentes, a fim de identificar as bandas de absorção. Os procedimentos experimentais foram os mesmos para os métodos utilizados, PAS UV-Vis e FTIR-PAS.

3.2 Espectroscopia Fotoacústica para região UV-Vis

Os espectros de absorção óptica por meio da técnica de espectroscopia Fotoacústica nas regiões espectrais do UV-Vis foram adquiridos no intervalo de 270 a 600 nm, a frequência de modulação da luz foi ajustada em 9 Hz e a potência da lâmpada em 800 W. A representação esquemática da espectroscopia fotoacústica utilizada no experimento é apresentada na Figura 3.4.

A fonte de luz do aparato experimental é uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel, modelo 68820) com potência de até 1.000 W que emite na região espectral entre 180 e 4.000 nm. A luz gerada pela lâmpada passa por um monocromador (Oriel, modelo 77250, 1/8 m) que foi utilizado com fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 mm e uma grade de difração para a região espectral escolhida (Oriel, modelo 77296). A luz difratada passa por um filtro com o objetivo de bloquear ordens superiores de difração. Em seguida, a luz é modulada utilizando-se um modulador mecânico (Stanford Research Systems, modelo SR 540) que fornece ao amplificador, *Lock-in (EG&G PAR Instruments),* um sinal de referência. A luz monocromática modulada incide em um espelho de primeira superfície de prata, que

por sua vez, reflete a luz verticalmente, passando por duas lentes de quartzo convergentes, com o objetivo de focalizar o feixe na amostra, fazendo com que ela receba o máximo de intensidade possível.



Figura 3.4. Representação da montagem da fotoacústica para a região UV-Vis [14].

A célula fotoacústica utilizada neste experimento está representada na Figura 3.5. Ela é isolada de possíveis influências externas de pressão por meio de um anel de vedação. Antes de atingir a amostra, o feixe de luz é transmitido através de uma janela óptica de quartzo, que é transparente na região espectral do ultravioleta e do visível. Acoplado à célula fotoacústica tem-se um microfone (Brüel & Kjaer, modelo BK 2669) que está conectado ao *Lock-in* e uma fonte de alimentação. O *Lock-in* recebe o sinal detectado pelo microfone, fornecendo a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que, por sua vez, são transferidos para um microcomputador. O sinal fotoacústico adquirido é normalizado pelo sinal de referência obtido por uma amostra de pó de carvão ultrapuro, pois a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda. Assim, como o carvão absorve praticamente toda radiação incidente em todos os comprimentos de onda da região do visível, ao se normalizar as amplitudes dos sinais fotoacústicos em cada comprimento de onda pelo respectivo do carvão, obtém-se o espectro de absorção da amostra.



Figura 3.5. Representação lateral da célula fotoacústica fechada [44].

3.3 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia fotoacústica por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) é uma técnica utilizada para se obter espectros de absorção na região do infravermelho. As amostras foram medidas utilizando-se um Espectrômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (BRUKER, Vertex 70v) equipado com uma célula de detecção fotoacústica (Gasera, PA-301), como mostra a Figura 3.6. Todos os espectros foram adquiridos no modo *rapid scan* na faixa espectral de 3.725 a 1.000 cm⁻¹, com velocidade do espelho do interferômetro de 0,1 cm/s, equivalendo uma frequência de modulação de 1.6 KHz. A resolução espectral foi de 8 cm⁻¹. Para ter-se uma média de toda área da amostra, utilizou-se o diâmetro do feixe de 8 mm. Cada espectro obtido foi resultado de uma média de 64 varreduras.



Figura 3.6. Fotografia do equipamento FTIR-PAS utilizada no experimento.

A célula fotoacústica foi purgada com fluxo de gás hélio antes do início de cada medida. Este procedimento minimiza interferência da absorção de dióxido de carbono e das moléculas da fase gasosa de água, além de otimizar o sinal fotoacústico. As medidas foram realizadas com a célula selada.

A célula de detecção fotoacústica possui um microfone óptico tipo *cantilever* com um pré-amplificador que é conectado diretamente à câmara onde fica a amostra. O feixe modulado pelo interferômetro é focado por um espelho de ouro e direcionado para a amostra passando por uma janela óptica de seleneto de zinco. Um microcomputador conectado ao espectrômetro faz a aquisição dos dados via software (OPUS 7.5). Os interferogramas são convertidos em espectros via transformada de Fourier e a normalização é feita em relação ao espectro do carvão ultrapuro (*background*). A Figura 3.7 mostra o esquema representativo do espectrômetro, incluindo-se o detalhe a célula fotoacústica.



Figura 3.7. Esquema representativo da espectroscopia fotoacústica no infravermelho por transformada de Fourier. Adaptado [47].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e analisados os resultados obtidos pelos dois métodos, espectroscopia fotoacústica nas regiões do ultravioleta e do visível e espectroscopia fotoacústica na região do infravermelho médio por transformada de Fourier. A estratégia adotada para análise dos espectros de absorção do UV-Vis foi realizar deconvolução Gaussiana, enquanto que para os espectros de absorção do infravermelho foi feita identificação e cálculo das áreas das bandas de absorção associadas às emulsões como indicadores da permeação. Os resultados serão discutidos nesta ordem.

4.1 Comprimento de difusão térmica

Utilizando o valor da difusividade térmica da pele, $D = 4,1.10^{-4}cm^2s^{-1}$ [54], na equação (3) é possível calcular o comprimento de difusão térmica para os espectros no UV-Vis. A frequência utilizada foi de 9 Hz, portanto, a profundidade em que o calor gerado contribui para o espectro de absorção foi de aproximadamente 38 µm. Para os espectros no infravermelho, o comprimento de difusão térmica depende do número de onda, haja vista que para que todos os números de onda da luz atinjam a amostra ao mesmo tempo, o espelho do interferômetro muda de posição com uma dada velocidade. Desta forma, o comprimento de difusão térmica é escrito pela equação (4). Utilizamos a velocidade do espelho de v = 0,1 cm/s e considerando novamente a difusividade térmica da pele de $D = 4,1.10^{-4}cm^2s^{-1}$, obteve-se os comprimentos de difusão térmica que variaram entre 3 e 6 µm ao longo da região espectral adotada, conforme mostra a Figura 4.1. Ou seja, nesta região espectral do infravermelho a espessura de prova da medida depende do número de onda e se localiza muito próxima da superfície onde a radiação é incidida.

A Figura 4.2 mostra as regiões das amostras monitoradas durante a realização do experimento. O valor médio da espessura das amostras foi de aproximadamente 756 µm. No experimento foi realizada a medida da face externa (epiderme) e interna (derme) da pele para a detecção da emulsão. Quando a superfície de iluminação era a derme, significa que a leitura era realizada nas

camadas mais profundas da pele, cerca de 718 μm para o experimento PAS UV-Vis e entre 753 e 750 μm para o experimento FTIR-PAS.



Figura 4. 1. Comprimentos de difusão térmica da amostra de pele para PAS UV-Vis e FTIR-PAS.



Figura 4. 2. Esquema representativo da profundidade monitorada no experimento. (A) PAS UV-Vis com incidência de luz na epiderme (lado esquerdo) ou na derme (lado direito) e (B) FTIR-PAS com incidência de luz na epiderme (lado esquerdo) ou na derme (lado direito).

4.2 PAS UV-Vis

4.2.1 Espectros de absorção óptica das emulsões

Para a realização do experimento da fotoacústica no ultravioleta e visível, primeiramente foram obtidos os espectros de absorção de todas as emulsões e seus componentes de modo a identificar suas bandas de absorção para servir de referência após sua aplicação na pele (Figura 4.3). Nota-se que as emulsões absorvem a radiação em uma ampla região do espectro e, como será mostrado mais adiante, a pele também absorve nesta região espectral.



Figura 4. 3. Espectros de absorção óptica das emulsões e seus componentes.

Para avaliar a contribuição dos componentes da emulsão – nanocristais de celulose, saponinas e óleo – para cada espectro, foram realizados ajustes com funções gaussianas, conforme apresentado na Figura 4.4. O ajuste gaussiano

permite a deconvolução das bandas de absorção para possível correlação com os compostos que constituem a formulação. Este procedimento matemático foi realizado para cada espectro mantendo-se os centros das bandas fixos e suas respectivas larguras e áreas ajustáveis. Antes de realizar os ajustes, os espectros foram convertidos para cm⁻¹.



Figura 4. 4. Espectros de absorção óptica das emulsões ajustados com curvas gaussianas. (A) Emulsão01 (0%N+5%S); (B) Emulsão02 (0,5%NC+5%S); (C) Emulsão03 (5%NC+8%S); (D) Emulsão04 (10%NC+6,5%S).

Por meio desse tratamento matemático, pode-se representar a absorção das emulsões por uma curva teórica ajustada pela soma de três (Figura 4.4 A) ou quatro gaussianas (Figura 4.4 B, C e D) centradas em torno de 260, 313, 361 e 452 nm. As bandas ajustadas foram associadas à presença dos nanocristais de celulose, saponinas e óleo, respectivamente, com base nos espectros obtidos de cada componente individual, exceto pela banda em 260 nm que foi incluída somente para conseguir o ajuste, já que a mesma não será considerada na análise de permeação da emulsão porque a pele tem absorção nessa região espectral. Para a formulação

sem a inclusão de nanocristais de celulose, a gaussiana em 361 nm não foi incluída, fazendo-se o ajuste considerando apenas três bandas de absorção.

4.2.2 Medidas de permeação na pele

Uma vez adquiridos os espectros de absorção óptica das emulsões, se obteve os espectros de absorção da pele controle. A Figura 4.5 mostra os espectros da pele controle para a medida realizada iluminando-se o lado da epiderme, curva em preto, e da derme, curva em vermelho. A banda em torno de 405 nm é a banda Soret da hemoglobina proveniente de possíveis resíduos de sangue presentes na região [55].



Figura 4. 5. Espectros de absorção óptica da derme e epiderme controle da orelha de suínos.

O próximo passo foi realizar a leitura da pele com a aplicação da emulsão. A Figura 4.6 mostra os espectros de absorção óptica da epiderme uma hora após a

administração tópica das emulsões. Pode-se verificar que os espectros obtidos mostram a presença das emulsões na epiderme uma hora após sua administração.



Figura 4. 6. Espectros de absorção óptica da epiderme controle e epiderme uma hora após a aplicação da emulsão.

As medidas para a análise da permeação da emulsão foram feitas iluminando-se o lado da derme, lado oposto em relação ao qual houve a aplicação da emulsão. A Figura 4.7 ilustra os espectros de absorção da derme controle e da derme com cada formulação utilizada neste trabalho. Observa-se as diferenças nos espectros, especialmente entre 300 e 450 nm. Como esperado, a contribuição para o espectro final é bem menos evidente quando comparado ao obtido anteriormente para a epiderme, uma vez que a quantidade da formulação que eventualmente atinge a derme deve ser cada vez menor à medida que a profundidade de penetração aumenta, devido ao fato de que no caminho percorrido pela emulsão, esta pode sofrer absorção pela grande quantidade de vasos sanguíneos presentes na derme.



Figura 4. 7. Espectros de absorção óptica da derme controle e da derme uma hora após a aplicação da emulsão na epiderme da orelha de suínos.

Para identificar e visualizar a presença das formulações na derme, os espectros foram ajustados utilizando-se funções gaussianas. Inicialmente, o procedimento matemático foi realizado para o espectro de absorção óptica da derme controle, fixando os centros das gaussianas de acordo com os dados da literatura [55, 56]. Foi necessário utilizar quatro gaussianas para que a curva teórica reproduzisse a curva experimental (Figura 4.8).



Figura 4. 8. Ajuste gaussiano do espectro de absorção óptica da derme controle da orelha de suínos.

Realizou-se um estudo para se definir a melhor escolha do centro de cada gaussiana presente no espectro de absorção da pele. Os centros escolhidos foram em aproximadamente 270, 343, 403 e 478 nm. Os autores Anderson e Parrish [56] relacionaram os componentes da pele com suas regiões de absorção. Segundo esses autores, as bandas em torno de 275 nm são geradas pela absorção óptica da tirosina e do triptofano, aquelas entre aproximadamente 300 e 500 nm provenientes principalmente da absorção da bilirrubina e betacaroteno e a centrada em aproximadamente 400 nm, como descrito anteriormente, é atribuída a absorção Soret do sangue. A estrutura complexa da pele apresenta pequenas variações de um animal para outro. Desta forma, conforme descrito em materiais e métodos, os estudos foram realizados em triplicata. Assim, cada espectro apresentado é uma média de três amostras.

Para identificar a presença da emulsão na derme foram utilizados os parâmetros obtidos dos ajustes gaussianos da derme controle e das emulsões. Neste caso, os valores relacionados aos centros, áreas e larguras das gaussianas da derme controle foram mantidos fixos e foram adicionadas as gaussianas referentes à presença da emulsão, para estas, foram mantidos fixos apenas os centros. A Figura 4.9 mostra os ajustes. A curva em preto é o espectro obtido experimentalmente, aquela em vermelho, o ajuste teórico, aquela em vinho atribuída à absorção dos nanocristrais de celulose, em rosa à absorção da saponinas e em azul, à absorção do óleo. Com o objetivo de realçar as gaussianas geradas pela absorção óptica da emulsão, mostra-se um uma ampliação da curva no lado direito superior de cada figura.



Figura 4. 9. Espectros de absorção óptica (ajustados com curvas gaussianas) da derme uma hora após a aplicação de emulsão na epiderme da orelha de suínos. (A) Emulsão01 (0%N+5%S); (B) Emulsão02 (0,5%NC+5%S); (C) Emulsão03 (5%NC+8%S); (D) Emulsão04 (10%NC+6,5%S).

Comparando-se os espectros é possível observar que a absorção dos componentes da emulsão possui baixa intensidade, assim como aparece em comprimentos de onda bem próximos ao da derme controle, o que dificulta a análise de alterações no espectro. Mesmo assim, esses resultados para a iluminação do lado da derme, lado oposto àquele onde a emulsão foi aplicada, indicam que ocorreu a permeação, uma vez que as gaussianas referentes aos nanocristais de celulose

(313nm), a saponinas (361nm) e ao óleo (478nm) estão contribuindo para a curva espectral.

Como o procedimento de ajuste com funções gaussianas adotado foi o mesmo em todos os espectros de absorção óptica da Figura 4.9, pode-se quantificar a propagação de cada componente da emulsão por meio das áreas obtidas nos ajustes, que estão mostradas na Figura 4.10.



Figura 4. 10. Área das gaussianas centradas em 313, 361 e 452 nm referentes aos nanocristais de celulose, as saponinas e o óleo, respectivamente.

A Figura 4.10 expressa a avaliação da presença de emulsão na derme, considerando a profundidade média, exemplificada na seção 4.1, de aproximadamente 718 µm a partir da superfície da epiderme. Nota-se que todas as emulsões se propagaram através da derme, sugerindo, que as mesmas possam ser utilizadas como veículos para fármacos de aplicação tópica. Apesar da emulsão 04 (10%NC+6,5%S) aparentemente ter apresentado menor taxa de permeação, o valor

obtido para a gaussiana referente aos nanocristais de celulose (313) e saponinas (361) está dentro do erro da medida.

Para uma forma farmacêutica estar completa é necessário ter o veículo e a substância ativa. O veículo, neste caso a emulsão, tem a finalidade de levar o ativo, tanto às saponinas e quanto os nanocristais de celulose foram utilizados nesta emulsão com o intuito de permear o óleo, pois é onde a substância ativa seria incorporada [6, 20]. Portanto, a técnica PAS UV-Vis permite determinar qual foi a melhor emulsão, isto é, o veículo que apresentou o melhor resultado em termos farmacêuticos, sendo este, a emulsão 02 (0,5%NC+5%S), a qual exibe a maior quantidade de difusão do óleo.

4.3 FTIR – PAS

4.3.1 Espectros de absorção óptica das emulsões no IR

A espectroscopia fotoacústica no infravermelho por transformada de Fourier tem sido usada com sucesso para se analisar as propriedades físico-químicas de tecidos biológicos [9, 57]. Este método fornece bandas de absorção que podem ser consideradas como "impressão digital" para caracterização das estruturas das moléculas que compõem os tecidos biológicos. Neste trabalho, a FTIR-PAS foi utilizada para o estudo da propagação das emulsões através da pele.

Repetiu-se o experimento de permeação com a técnica FTIR-PAS com o intuito de comparar e complementar os resultados obtidos por meio da técnica PAS UV-Vis. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que o estudo de difusão de uma formulação na pele é feito comparando-se as medidas no UV-Vis com as de FTIR-PAS no IR.

A Figura 4.11 apresenta os espectros de absorção óptica de todas as emulsões e de seus componentes. As medidas foram feitas no intervalo espectral entre 3.725 e 1.000 cm⁻¹.

Nota-se que existe um comportamento similar entre os espectros das emulsões (Figura 4.11 (A)), devido ao fato de seus componentes apresentarem bandas de absorção similares. As bandas identificadas nos espectros das emulsões,

centradas em torno de 3.006, 2.926 e 2.856 cm⁻¹ são atribuídas às ligações do tipo C-H, o pico em 1.745 cm⁻¹ é referente ao estiramento C=O e a banda próxima de 1.165 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de C-O [58, 59]. A análise será feita com base nessas regiões do espectro visando identificar a permeação da emulsão na pele.



Figura 4. 11. Espectros de absorção óptica no infravermelho (A) das emulsões e (B) de seus componentes, saponinas, nanocristais de celulose suspensos em água e óleo.

4.3.2 Análise de permeação na pele

A partir da identificação dos picos de interesse da emulsão, obteve-se o espectro de absorção entre 3.725 e 1.000 cm⁻¹ da pele controle da orelha de suínos (Figura 4.12). Adotou-se o mesmo procedimento utilizado nas medidas realizadas na região espectral do UV-Vis. A média também foi feita a partir dos dados da medida de três amostras de pele.



Figura 4. 12. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme e epiderme controle da orelha de suínos.

A análise foi feita considerando-se as três regiões espectrais especificadas na emulsão, que no espectro da derme controle são: as bandas de absorção entre 3.000 e 2.830 cm⁻¹, relacionadas aos estiramentos simétrico e anti-simétrico de C-H dos grupos de proteínas e lipídeos, o pico em 1.745 cm⁻¹ referente à vibração de estiramento C=O e em 1.164 cm⁻¹ correspondente à ligação C-O [57, 60, 61, 62]. Assim como feito no experimento usando a técnica PAS UV-Vis, uma hora após a aplicação da emulsão na epiderme a leitura foi realizada. A medida realizada iluminando-se o lado onde a emulsão foi aplicada resultou em um espectro parecido com o da formulação, como mostrado na Figura 4.13.



Figura 4. 13. Espectros absorção óptica no infravermelho da epiderme controle e da epiderme uma hora após da aplicação de emulsão.

A Figura 4.14 mostra os espectros de absorção obtidos pela medida da derme uma hora após a aplicação da emulsão na epiderme. Para fazer uma comparação com o intuito de identificar se estava ocorrendo alguma interação entre o tecido e a emulsão, aplicou-se a emulsão diretamente na derme, o espectro obtido é mostrado na Figura 4.15. Todos os espectros, incluindo o espectro da derme controle, foram corrigidos por linha de base e normalizados em relação à banda da pele em 1.242 cm⁻¹ (amida III do colágeno) [60, 62, 63]. A escolha deste pico foi com base na observação de que ele não se alterou para todas as amostras e também porque não foi utilizado na análise.



Figura 4. 14. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme controle em comparação a derme uma hora após a aplicação da emulsão na epiderme da orelha de suíno, com destaque para as regiões onde ficaram mais evidente a diferença entre elas. (A) Emulsão01 (0%N+5%S); (B) Emulsão02 (0,5%NC+5%S); (C) Emulsão03 (5%NC+8%S); (D) Emulsão04 (10%NC+6,5%S).



Figura 4. 15. Espectros de absorção óptica no infravermelho da derme controle e da derme com aplicação da emulsão na derme da orelha de suínos.

Analisando-se as Figuras 4.14 e 4.15, observa-se que não ocorreram modificações nas bandas da pele devido à aplicação da emulsão, ou seja, não houve aparecimento, desaparecimento, deslocamentos ou mudança de bandas, inferindo que a técnica não detectou possíveis interações químicas das formulações com a pele. O que pode sugerir que os componentes da fórmula não provocaram alterações físico-químicas nas moléculas do tecido, indicando que pode não ter havido efeitos adversos provocados pela formulação. Além disso, é possível identificar as bandas da emulsão nos espectros da derme que recebeu a emulsão na epiderme, o que indica que houve a permeação. A diferença dos espectros na região entre 3600 e 3000 cm⁻¹ é devido aos diferentes índices de umidade em cada amostra.

Para tentar quantificar as bandas analisadas com o intuito de avaliar a permeação da emulsão, realizou-se também um ajuste matemático a partir do cálculo da área escolhida usando se uma função integral. Os intervalos selecionados

foram aproximadamente: 3.019 – 2.836 cm⁻¹, 1.782 – 1.730 cm⁻¹ e 1.180 – 1.140 cm⁻¹. No momento do cálculo da área, traçou-se uma linha de base interligando os dois extremos da região, obtendo-se a apenas área do pico. Os valores das áreas obtidos são mostrados na Figura 4.16.



Figura 4. 16. Área obtida pelo cálculo da integral nas regiões: 3.019 – 2.836, 1.782 – 1.730 e 1.180 – 1.140 cm⁻¹ dos espectros de absorção óptica no infravermelho da derme controle e da derme com aplicação da emulsão na epiderme.

Na Figura 4.16 observa-se que todas as emulsões permearam até a derme atingindo profundidades na pele entre aproximadamente 750 e 753 µm, em concordância com o observado nas medidas anteriores nas regiões espectrais do UV-Vis. Novamente, a emulsão 04 (10%NC+6,5%S) apresentou menor taxa de permeação em comparação com as outras. De fato, seu espectro e área, praticamente reproduzem o comportamento observado para a derme controle. Uma possível explicação para essa emulsão ter apresentado menor permeação é sua textura mais viscosa em relação às outras formulações, podendo estar ocorrendo aglomerações dos nanocristais de celulose devido a sua quantidade. Segundo Chevalier [35], a grande quantidade de partículas sólidas ocasiona o espessamento das emulsões, em casos extremos a emulsão é gelificada. Porém, essa alta viscosidade pode ser vantajosa em termos de aplicações práticas, pois contribui para desacelerar fenômenos de desestabilização. O autor ainda comenta que no caso do uso da sílica como partículas sólidas, concentrações superiores a aproximadamente 10% não são práticas porque torna a fase aquosa muito viscosa. Para Markus [1], sistemas com alta viscosidade dificulta a difusão da fase oleosa formando um gradiente de concentração. Sendo importante ressaltar que nos experimentos realizados para ambas as técnicas foram tomados os devidos cuidados para se evitar possíveis interferências de fatores externos (rugosidade da pele, tempo de armazenamento das amostras, idade do animal, entre outros) nos resultados finais.

Nos espectros das emulsões (Figura 4.11), o componente que mais contribui para as bandas da emulsão é o óleo. Assim, pode-se afirmar que o mesmo está se propagando através da pele, porém, em relação às saponinas e nanocristais de celulose não há uma banda associada apenas a esses componentes, de modo que por esta técnica não é possível analisar individualmente a propagação dos componentes da emulsão, como feito para o método PAS UV-Vis. Portanto, por meio das figuras anteriores obtidas pela técnica FTIR-PAS, pode-se afirmar que as emulsões como um todo se difundiram através da pele.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, nesta dissertação a espectroscopia fotoacústica foi utilizada nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível e do infravermelho por transformada de Fourier para se avaliar *ex vivo* a difusão na pele da orelha de suínos de emulsões contendo óleo e saponinas derivados da planta *Sapindus saponaria L.* e nanocristais de celulose.

Os resultados de ambos os métodos evidenciaram a permeação das quatro emulsões utilizadas. Com a espectroscopia fotoacústica no ultravioleta e no visível foi possível detectar a presença das quatro formulas na derme, constatando-se que os componentes das emulsões, nanocristais de celulose, saponinas e óleo se propagaram através da pele atingindo as camadas mais profundas da derme. Os resultados do ajuste matemático com funções gaussianas realizado nos dados obtidos com a técnica PAS UV-Vis mostraram que a emulsão 02 (0,5%NC+5%S) apresentou melhor relação entre nanocristais de celulose e saponinas em termos do processo de propagação da emulsão, sendo, portanto, o veículo com a melhor condição para a incorporação do fármaco. Nas medidas de fotoacústica no infravermelho médio por transformada de Fourier, as bandas da emulsão também foram detectadas na superfície da derme, também confirmando a difusão da formulação através da pele. Os resultados na região do infravermelho não evidenciaram alteração físico-química na pele como resultado da interação da mesma com as emulsões, uma vez que as bandas dos tecidos das regiões medidas não foram modificadas após a aplicação da emulsão, o que pode significar ausência de efeitos adversos na estrutura da pele.

Para os dois métodos de espectroscopia fotoacústica o cálculo da área das bandas evidenciou que a emulsão 04 (10%NC+6,5%S) teve menor taxa de permeação quando comparada com as demais, provavelmente em razão da sua maior viscosidade devido ao espessamento da fase aquosa que é fortemente dependente da proporção de nanocristais de celulose. Ou seja, maior viscosidade resultou em menor taxa de propagação da emulsão através das camadas da pele [1, 64].

A vantagem de se ter utilizado os métodos PAS UV-Vis e FTIR-PAS para avaliar o mesmo processo de difusão de formas farmacêuticas através da pele de orelha de suínos, foi que eles se complementaram e se convalidaram: os dois permitiram detectar a permeação da emulsão, e em especial, a fotoacústica na região do ultravioleta e visível possibilitou a identificação da contribuição da difusão de cada componente da formulação separadamente, o que não foi possível por meio da fotoacústica na região do infravermelho. Por outro lado, a partir da observação de que não houve alteração dos espectros no infravermelho tanto das formulações quanto da pele, indica que não houve degradação da composição das emulsões e nem eventuais danos na estrutura da pele. Isto sugere que a técnica fotoacústica no infravermelho pode ser uma importante ferramenta para se avaliar possíveis alterações físico/químicas eventualmente induzidas por formulações topicamente aplicadas em tecidos biológicos.

Portando, os resultados deste trabalho evidenciaram a eficiência das emulsões em permear através dos tecidos da pele e também a eficácia da combinação das duas técnicas para detectar esse processo. Finalmente, os resultados deste trabalho sugerem que a aplicação dos métodos de espectroscopia fotoacústica nesse tipo de análise é uma ferramenta promissora para o estudo da difusão de formulações de uso tópico em sistemas biológicos.

6 REFERÊNCIAS

[1] MARKU, D. et al. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 428, p. 1-7, 2012.

[2] FRELICHOWSKA, J. et al. Pickering w/o emulsions: drug release and topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 368, p. 7-15, 2009.

[3] MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of food science*, v. 72, n. 8, p. R109-R124, 2007.

[4] SALAGER, J. L. Emulsion Properties and Related Know-how to Attain Them. *Pharmaceutical emulsions and suspensions,* cap. 3, New York, Marcel Dekker Inc., 2000.

[5] ALBIERO, A. L.; M. BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S. M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiaum*, v. 23, n. 2, p. 549 – 560, 2001.

[6] PELEGRINI, B. L. Aplicações tecnológicas do óleo de *Sapindus saponaria L*.: Desenvolvimento, caracterização térmica e reológica de biodiesel e de sistemas emulsionados estabilizados por saponinas triterpênicas e nanocristais de celulose. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

[7] MULATI, A. C. N. Avaliação físico química de complexos de inclusão de insulina e curcumina em ciclodextrinas: estudo com as espectroscopias Raman, FTIR e fotoacústica. *Tese de Doutorado*, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

[8] BAESSO, M. L.; SNOOK, R. D.; ANDREW, J. J. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy to study the penetration of substances through skin. *Le Journal de Physique IV*, v. 4, n. C7, p. C7-449-C7-451, 1994.

[9] MORATO, E. M. et al. Morphological and Structural Changes in Lung Tissue Infected by *Paracoccidioides brasiliensis*: FTIR Photoacoustic Spectroscopy and Histological Analysis. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, p. 1170-1175, 2013. [10] DIAS, D. T. et al. Thermal characterization *in vitro* of human nail: photoacoustic study of the aging process. *Photochemistry and Photobiology*, v. 83, n. 5, p. 1144-1148, 2007

[11] OCCHI-ALEXANDRE, I. G. P. et al. Evaluation of photosensitizer penetration into sound and decayed dentin: A photoacoustic spectroscopy study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 21, p. 108-114, 2018.

[12] VEIGA, F. F. et al. Propolis extract for onychomycosis topical treatment: From bench to clinic. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 779, 2018.

[13] CAMPANHOLI, K. da S. S. et al. Biomedical Platform Development of a Chlorophyll-Based Extract for Topic Photodynamic Therapy: Mechanical and Spectroscopic Properties. *Langmuir*, v. 34, n. 28, p. 8230-8244, 2018.

[14] SEHN, E. Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

[15] ROCHA, J. C. B. et al. *Ex vivo* evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Analytica chimica acta*, v. 587, n. 1, p. 132-136, 2007.

[16] SEHN, E. et al. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin *in vivo*: A statistic treatment. *Review of scientific Instruments,* v. 74, n. 1, p. 758-760, 2003.

[17] TUNIN, L. M. et al. Employing photoacoustic spectroscopy in the evaluation of the skin permeation profile of emulsion containing antioxidant phenolic-rich extract of Melochia arenosa. *Pharmaceutical biology*, v. 54, n. 1, p. 139-145, 2015.

[18] SANKHE, S. Y.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Characterization of erucamide profiles in LLDPE films: depth-profiling attempts using FTIR photoacoustic spectroscopy and Raman microspectroscopy. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, v. 19, n. 1, p. 16-29, 2003.

[19] SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho.* 2. ed. São Paulo: UNESP, 2008.

[20] PELEGRINI, B. L. Investigação das propriedades interfaciais e de emulsificação de nanocristais de celulose e saponinas extraídas de *Sapindus saponaria L.* (SAPINDACEAE). *Tese de Doutorado*, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

[21] KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

[22] DA CUNHA, A. P et al. *Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia.* 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

[23] VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. *Surgery* (*Oxford*), v. 28, n. 10, p. 469-472, 2010.

[24] BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in lipid research,* v. 42, n. 1, p. 1-36, 2003.

[25] KOTLA, N. G. et al. Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 3, n. 7, p. 1262-1272, 2017.

[26] SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A Review on Mechanisms for the Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs. *Scientia Pharmaceutica*, v. 87, n. 3, p. 17, 2019.

[27] BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001

[28] DICKINSON, Eric. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009.

[29] CHUNG, C. et al. Formulation of food emulsions using natural emulsifiers: Utilization of quillaja saponin and soy lecithin to fabricate liquid coffee whiteners. *Journal of Food Engineering*, v. 209, p. 1-11, 2017.

[30] PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos *Ciência Rural*, v. 45, n. 1, p. 155-162, 2015.

[31] YAHAYA KHAN, M. et al. Current trends in water-in-diesel emulsion as a fuel. *The Scientific World Journal*, v., 2014.

[32] PAUL, B. K.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. *Current Science*, v. 80, n. 8, p. 990-1001, 2001.

[33] HELLWEG, T.; EIMER, W. The microstructures formed by Ni²⁺-AOT/cyclohexane/water microemulsions: a light scattering study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 136, p. 97–107, 1998.

[34] MOULIK, S. P. et al. Studies on the interfacial composition and thermodynamic properties of w/o microemulsions. *Langmuir*, v. 16, p. 3101-3106, 2000.

[35] CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 439, p. 23–34, 2013.

[36] POZZA, B. M. de F. et al. Avaliação da Estabilidade de Emulsões Cosméticas Elaboradas com Saponinas de Juá (Ziziphus joazeiro) e Sisal (Agave sisalana). *Visão Acadêmica*, v. 17, n. 3, 2016.

[37] KARGAR, M. et al. Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 366, p. 209-215, 2012.

[38] KALASHNIKOVA, I. et al. Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules*, v. 13, p. 267-275, 2012

[39] HUBBE, M. A. et al. Cellulosic nanocomposites: a review. *BioResources*, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.

[40] BELL, A. G. On the Production and Reproduction of Sound by Light. *American Journal of Science* (1880-1910), v. 20, n. 118, p. 305, 1880.

[41] DE CASTRO, L. V. Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e raman, *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 2015.

[42] ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, v. 47, 64-69, 1976.

[43] ROSENCWAIG, A. Biological studies with photoacoustic spectroscopy. *Bulletin of The American Physical Society*, v. 21, n. 3, 221-221, 1976.

[44] ASTRATH, A. C. Espectroscopia Fotoacústica: Determinação das Taxas de Difusão de Complexos Nanoencapsulados na Pele e de Fotossensibilizadores na Dentina. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

[45] BULTS, Gerard et al. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange. *Biochimica et Biophysica Acta,* v. 679, n. 3, p. 452-465, 1982.

[46] ROSENCWAIG, A. Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy. Wiley, 1980.

[47] BRUKER OPTIK OPTIK GMBH, Vertex 70v User Manual. Ettlingen, Germany, 2007.

[48] OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, v. 4, p. 24-30, 2001.

[49] PENNER, M. H. Basic principles of spectroscopy. In: *Food analysis,* Springer, Cham, 2017. p. 79-88.

[50] NAKAMOTO, K. Infrared spectra of inorganic and coordination compounds. 1970.

[51] Chemistry LibreTexts. Number of vibrational modes for a molecule. University of California. 2016. Disponível em:

https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/ Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Number_of_vibrational_modes_for_a_ molecule. Acesso em 15 de agosto de 2019 [52] Unesp. Disponível em: http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm. Acesso em: 15 de agosto de 2019

[53] STAURT, B. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, England, v. 10, p. 0470011149, 2004.

[54] BROWN, S. M. et al. Thermal diffusivity of skin measured by two photothermal techniques. *Analytica chimica acta*, v. 282, n. 3, p. 711-719, 1993.

[55] BARROS, A. E. B.. Estudos espectroscópicos da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp).. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, 2014.

[56] ANDERSON, R. R., PARRISH, J. A. The Optics of Human Skin. *Journal of investigative dermatology*, v. 77, n. 1, p. 13-19, 1981.

[57] DE PAULO, L. F. et al. Crude extract of Fusarium oxysporum induces apoptosis and structural alterations in the skin of healthy rats. *Journal of biomedical optics*, v. 18, n. 9, p. 095004, 2013.

[58] ALMUTAIRI, M. S.; ALI, M. Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR. *Natural product research*, v. 29, n. 13, p. 1271-1275, 2015.

[59] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Cyanolipids from *Sapindus saponaria* L. seeds oil. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 15, n. 6, p. 364-372, 2016.

[60] KONG, R.; BHARGAVA, R.. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. *Analyst*, v. 136, n. 11, p. 2359-2366, 2011.

[61] WONG, Patrick TT et al. Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Research*, v. 53, n. 4, p. 762-765, 1993.

[62] UR REHMAN, I.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.. Vibrational spectroscopy for tissue analysis. CRC press, 2012.

[63] MCINTOSH, L. M. et al. Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 112, n. 6, p. 951-956, 1999.

[64] SALAS, Carlos et al. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 19, n. 5, p. 383-396, 2014.