



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Caracterização química dos óleos essenciais de
Lavandula angustifolia e *Lavandula dentata*, ensaios
“in vitro” e aplicação em nanoemulsões

Bruna Kauffmann Figueiredo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara - SP
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Caracterização química dos óleos essenciais de
Lavandula angustifolia e *Lavandula dentata*, ensaios
“in vitro” e aplicação em nanoemulsões

Bruna Kauffmann Figueiredo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara - SP
2019

F475c Figueiredo, Bruna Kauffmann.
Caracterização química dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata*, ensaios "in vitro" e aplicação em nanoemulsões / Bruna Kauffmann Figueiredo. – Araraquara: [S.n.], 2019.
126 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. *Lavandula angustifolia*. 2. *Lavandula dentata*. 3. Citotoxicidade. 4. Eficácia. 5. Nanoemulsões. 6. Tensoativo sustentável. 7. Estabilidade
I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família! Aos meus pais, Rita e Eduardo, e ao meu irmão, Leandro, pelo amor que sentem por mim, e por todo o apoio e alegria que me deram neste período e em toda a minha vida. Se não fosse por vocês, eu não conseguiria suportar todas as dificuldades que surgiram no caminho.

Descobri como é importante ter vocês sempre ao meu lado!

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela vida, pela proteção, pela família que tenho e pela oportunidade de realizar esse sonho.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** e ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

À **Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac** que abriu as portas do Laboratório de Cosmetologia, e mesmo sem me conhecer, aceitou que eu fosse sua aluna, possibilitando que este trabalho fosse realizado.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Prof. Dr. Márcio Ferrari, Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho e Prof.^a Dr.^a Elissa Arantes Ostrosky** pelas sugestões e ensinamentos que contribuíram para enriquecer este trabalho.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos concedida.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) pelo apoio financeiro à pesquisa - Código de Financiamento 001.

Ao **Lavandário - Cultivo de Lavanda e Ervas Aromáticas** pela doação dos óleos essenciais da *Lavandula angustifolia* e da *Lavandula dentata*.

A **Innovasell** pela doação do tensoativo Resassol[®] Apostrophe utilizado no desenvolvimento das nanoemulsões.

Ao **Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN)** da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense e ao **Laboratório de Métodos Analíticos** da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais doados.

Ao **Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides (LMMC)** e ao **Departamento de Química Analítica** do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, onde foram realizados os ensaios de espalhamento de luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering* - DLS) e potencial Zeta.

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais e equipamentos que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Cláudia, Daniela, Aniele, Adriano e, principalmente, Ilza Yogui, por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os meus **colegas do Laboratório de Cosmetologia**: Beatriz Leone, Bruna C., Bruna S. R., Fernanda C., Isabela, Jéssica, Maria Gabriela, Natália R., Vitória e Wagner por estarem sempre dispostos a ajudar.

As minhas **amigas do mestrado**: Any Carolina, Danieli, Élida, Fernanda Borges e Gabriela por toda a amizade, risadas, apoio e, principalmente, aprendizado.

E também aos **amigos que não são da faculdade**, em especial: Carol, Izabela e Paula por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos que precisei de paciência e ânimo, incentivando-me a não desistir desse sonho e celebrando comigo cada vitória conquistada.

Muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	A pele	18
2.1.1.	Cicatrização	20
2.2.	Óleos essenciais	22
2.2.1.	Óleo essencial de lavanda	24
2.3.	Nanotecnologia em cosméticos	27
2.3.1.	Nanoemulsões	28
2.3.1.1.	Métodos de obtenção	30
2.3.1.2.	Métodos de caracterização	32
2.3.1.3.	Vantagens das nanoemulsões	33
2.3.2.	Segurança de nanomateriais	34
3.	OBJETIVOS	36
3.1.	Objetivos gerais	36
3.2.	Objetivos específicos	36
4.	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1.	Obtenção dos óleos essenciais	37
4.2.	Caracterização química dos óleos essenciais	37
4.3.	Avaliação do potencial antioxidante	38
4.3.1.	Metodologia de inibição do radical DPPH•	38
4.3.2.	Metodologia de inibição do radical ABTS•+	39
4.4.	Avaliação da citotoxicidade	40
4.5.	Avaliação da produção de colágeno	43
4.6.	Desenvolvimento das nanoemulsões	45
4.6.1.	Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)	45
4.6.2.	Determinação da porcentagem dos componentes para obtenção do mesmo EHL	47
4.6.3.	Determinação dos tensoativos	47
4.6.4.	Distribuição do tamanho de gotícula e potencial Zeta	48
4.7.	Avaliação da estabilidade física das formulações	48
4.8.	Análise estatística dos resultados	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.1.	Caracterização química dos óleos essenciais	50
5.2.	Avaliação do potencial antioxidante	55
5.2.1.	Atividade de inibição do radical DPPH•	55
5.2.2.	Atividade de inibição do radical ABTS•+.....	59
5.3.	Avaliação da citotoxicidade	63
5.4.	Avaliação da produção de colágeno	70
5.5.	Determinação das nanoemulsões	77
5.5.1.	Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)	77
5.5.2.	Determinação da porcentagem dos componentes para obtenção do mesmo EHL	80
5.5.3.	Determinação dos tensoativos	85
5.6.	Avaliação da estabilidade física das formulações	92
5.6.1.	Análise macroscópica.....	92
5.6.2.	Determinação do valor do pH.....	92
5.6.3.	Distribuição do tamanho de gotícula e potencial Zeta	93
6.	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXOS	117
	APÊNDICES	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da pele humana (Adaptado de PDQ® SCREENING AND PREVENTION EDITORIAL BOARD, 2018).....	19
Figura 2. Ilustração retratando partes da <i>Lavandula angustifolia</i> (Adaptado de < http://www.tropicos.org/Image/6334 >).....	25
Figura 3. <i>Lavandula dentata</i> (LIM, 2014).....	26
Figura 4. Imagem de uma nanoemulsão contendo óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i> (esquerda) e água destilada (direita) (Elaborada pela autora).	30
Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais de lavanda (Elaborado pela autora: < www.mindthegraph.com >).	42
Figura 6. Estrutura utilizada para o desenvolvimento das nanoemulsões (Elaborada pela autora).	46
Figura 7. Porcentagem de inibição do radical DPPH• pelo ácido gálico.....	56
Figura 8. Porcentagem de inibição do radical DPPH• das soluções de óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	57
Figura 9. Porcentagem de inibição do radical DPPH• das soluções de óleo essencial da <i>L. dentata</i>	57
Figura 10. Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (RUFINO et al., 2007).....	60
Figura 11. Curva padrão de trolox.	60
Figura 12. Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das soluções de óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	61
Figura 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das soluções de óleo essencial da <i>L. dentata</i>	61
Figura 14. Estrutura química dos radicais DPPH• e ABTS•+ (Elaborado pela autora).	63
Figura 15. Curva de viabilidade celular para linhagem HDFa, após 24h de tratamento, com diferentes concentrações do óleo essencial da <i>Lavandula angustifolia</i> (Média dos valores de 3 experimentos independentes).	65
Figura 16. Curva de viabilidade celular para linhagem HDFa, após 24h de tratamento, com diferentes concentrações do óleo essencial da <i>Lavandula dentata</i> (Média dos valores de 3 experimentos independentes).	65

Figura 17. Imagem da microplaca com a não formação dos cristais de formazana dos óleos essenciais em relação ao controle negativo e ao solvente (Elaborada pela autora).....	68
Figura 18. Imagem da microplaca com a turvação formada em alguns poços do ensaio com a linhagem HaCat (Elaborada pela autora).....	69
Figura 19. Curva analítica da concentração de colágeno ($\mu\text{g/mL}$) versus a absorvância (550 nm).	71
Figura 20. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	72
Figura 21. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	72
Figura 22. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da <i>L. dentata</i>	73
Figura 23. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da <i>L. dentata</i>	73
Figura 24. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o etanol.....	74
Figura 25. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o etanol.....	74
Figura 26. Formulações obtidas referentes aos valores de EHL para o óleo essencial da <i>Lavandula angustifolia</i>	79
Figura 27. Formulações obtidas referentes aos valores de EHL para o óleo essencial da <i>Lavandula dentata</i>	79
Figura 28. Formulações obtidas com diferentes porcentagens de água destilada, tensoativos e óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	81
Figura 29. Formulações obtidas com diferentes porcentagens de água destilada, tensoativos e óleo essencial da <i>L. dentata</i>	82
Figura 30. Nanoemulsões preparadas com OE da <i>L. angustifolia</i> e diferentes pares de tensoativos: (A) Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20, (B) Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e (C) Resassol® Apostrophe.	87
Figura 31. Nanoemulsões preparadas com OE da <i>L. dentata</i> e diferentes pares de tensoativos: (A) Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20, (B) Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e (C) Resassol® Apostrophe.....	88

Figura 32. Distribuição do tamanho de gotícula da formulação preparada com os tensoativos Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	90
Figura 33. Distribuição do tamanho de gotícula da formulação preparada com o tensoativo Resassol [®] Apostrophie e óleo essencial da <i>L. dentata</i>	90
Figura 34. Valores de pH das nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante os 30 dias de análise.....	93
Figura 35. Distribuição do tamanho de gotícula das nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.	94
Figura 36. Valores do índice de polidispersão (PDI) obtidos para as nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.....	96
Figura 37. Valores de potencial Zeta obtidos para as nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes químicos (%) do óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	51
Tabela 2. Constituintes químicos (%) do óleo essencial da <i>L. dentata</i>	52
Tabela 3. Valores percentuais de EC ₅₀ (v/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade em células HDFa, com os óleos essenciais de lavanda.....	66
Tabela 4. Valores de EHL e composição percentual da mistura de tensoativos, óleo essencial e água destilada	78
Tabela 5. Composição percentual das formulações	80
Tabela 6. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de cada formulação preparada com o óleo essencial da <i>L. angustifolia</i>	83
Tabela 7. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de cada formulação preparada com o óleo essencial da <i>L. dentata</i>	83
Tabela 8. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de nanoemulsões preparadas com o óleo essencial da <i>L. angustifolia</i> e diferentes pares de tensoativos (EHL 12) na proporção 90:5:5	89
Tabela 9. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de nanoemulsões preparadas com o óleo essencial da <i>L. dentata</i> e diferentes pares de tensoativos (EHL 9) na proporção 85:10:5	89

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ABTS•+	Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EC ₅₀	Concentração efetiva de 50%
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EHLr	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido
e ⁻ V	Elétron volt
HaCat	<i>Immortalized Human Keratinocytes</i>
HDFa	<i>Human Dermal Fibroblasts adult</i>
HepG2	<i>Human Hepatoma cells</i>
IR	Índice de retenção
LAST	<i>Lavandula angustifolia</i> com Span [®] /Tween [®]
LDRA	<i>Lavandula dentata</i> com Resassol [®] Apostrophe
MTT	Methyl-thiazol-tetrazolium
mV	Milivolts
OE	Óleo essencial
OELA	Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>
OELD	Óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i>
OEs	Óleos essenciais
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PdI	<i>Polydispersity index</i>
v	Volume

RESUMO

O óleo essencial da lavanda tem sido usado amplamente nas indústrias cosmética e farmacêutica, demonstrando várias propriedades terapêuticas, tais como analgésica, anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antifúngica; porém, sua lipofilicidade dificulta a incorporação em formulações de matriz aquosa. Deste modo, a nanotecnologia vem surgindo como uma estratégia para melhorar o desempenho de ativos contidos nos cosméticos, e buscar sua aceitação pelo consumidor. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a citotoxicidade e o potencial cicatrizante, bem como a atividade antioxidante, dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata*, utilizando metodologias *in vitro*, e obter e caracterizar nanoemulsões contendo esses óleos. Também foram realizadas a identificação e a quantificação das substâncias químicas presentes nos óleos essenciais. No que diz respeito à eficácia, a atividade antioxidante foi analisada pela metodologia de inibição dos radicais DPPH• e ABTS•+, e o potencial cicatrizante pela avaliação do estímulo da produção de colágeno em células da linhagem HDFa. A citotoxicidade dos óleos também foi analisada, através da metodologia com o corante MTT, e as nanoemulsões foram obtidas pelo método de baixa energia, sob temperatura ambiente, determinando primeiramente o EHL de cada óleo para, em seguida, otimizar as formulações em relação à porcentagem dos componentes e tensoativos utilizados, com o emprego, também, de um tensoativo sustentável. As formulações escolhidas foram submetidas a duas condições de estresse, por um período de 30 dias de armazenamento, tendo a sua estabilidade avaliada em relação aos aspectos macroscópicos, pH, tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta. Os óleos apresentaram como componentes majoritários 1,8-cineol e cânfora. Foi possível observar atividade antioxidante dos óleos, porém são necessárias concentrações superiores que as da substância padrão para manter a mesma atividade. Os resultados do ensaio da citotoxicidade mostraram que ambos os óleos, quando usados na concentração de 0,156%, não foram citotóxicos para a linhagem HDFa; porém, foi sugerida a citotoxicidade para as linhagens HaCat e HepG2. Também não foi possível observar, por parte dos óleos, a indução na biossíntese de colágeno nas células HDFa utilizadas. No desenvolvimento das nanoemulsões, foram determinados EHL distintos para cada óleo, assim como as porcentagens dos componentes e os tensoativos utilizados também foram diferentes, mas apresentaram tamanho pequeno de gotícula, baixo índice de polidispersão e potencial Zeta próximo do valor indicativo de estabilidade máxima. As formulações selecionadas foram consideradas estáveis em todos os parâmetros analisados. Foi possível concluir que os óleos essenciais proporcionaram o desenvolvimento de nanoemulsões estáveis, seguras em concentração menor que 0,156% e eficazes, como antioxidantes, de acordo com os ensaios realizados.

Palavras-chave: *Lavandula angustifolia*; *Lavandula dentata*; citotoxicidade; eficácia; nanoemulsões; tensoativo sustentável; estabilidade.

ABSTRACT

Lavender essential oil has been widely used in the cosmetic and pharmaceutical industry, demonstrating various therapeutic properties such as analgesic, anti-inflammatory, healing, antimicrobial and antifungal; however, their lipophilicity makes incorporation into aqueous matrix formulations difficult. Thus, nanotechnology has been emerging as a strategy to improve the performance of cosmetics contained assets and seek their acceptance by the consumer. The objectives of this work were: to evaluate the cytotoxicity and healing potential, as well as the antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula dentata* essential oils, using *in vitro* methodologies, and to obtain and characterize nanoemulsions containing these oils. The identification and quantification of the chemicals present in the essential oils were also performed. Regarding efficacy, antioxidant activity was analyzed by the methodology of inhibition of DPPH• and ABTS•+ radicals, and the healing potential by evaluating the stimulation of collagen production in HDFa cells. The cytotoxicity of the oils was also analyzed using the MTT dye methodology, and the nanoemulsions were obtained by the low energy method at room temperature, first determining the HLB of each oil and then optimizing the formulations in relation to the percentage of the components and surfactants used, with the use of a sustainable surfactant. The chosen formulations were subjected to two stress conditions for a period of 30 days of storage and their stability was evaluated in relation to macroscopic aspects, pH, droplet size, polydispersion index and Zeta potential. The oils presented as major components 1,8-cineol and camphor. It was possible to observe antioxidant activity of the oils, but higher concentrations than the standard substance are necessary to maintain the same activity. The results of the cytotoxicity assay showed that both oils, when used at 0.156% concentration, were not cytotoxic to the HDFa strain; however, cytotoxicity was suggested for HaCat and HepG2 strains. It was also not possible to observe, by the oils, the induction of collagen biosynthesis in the used HDFa cells. In the development of nanoemulsions, distinct HLB were determined for each oil, as well as the percentages of the components and the surfactants used were also different, but presented small droplet size, low polydispersion index and Zeta potential close to the indicative value of maximum stability. The selected formulations were considered stable in all parameters analyzed. It was concluded that the essential oils provided the development of stable nanoemulsions, safe in concentration less than 0.156% and effective as antioxidants, according to the tests performed.

Keywords: *Lavandula angustifolia*; *Lavandula dentata*; cytotoxicity; efficiency; nanoemulsions; sustainable surfactante; stability.

1. INTRODUÇÃO

No mercado cosmético, uma das tendências é o desenvolvimento de produtos com componentes de origem natural. A incorporação de ativos vegetais tem sido uma prática cada vez mais frequente, pois existe grande interesse da indústria nacional e internacional, principalmente com a apresentação de estudos científicos comprovando a sua segurança e eficácia (FERRARI *et al.*, 2007).

A lavanda ou alfazema é cultivada em várias regiões do mundo, sendo conhecida como uma poderosa erva aromática e medicinal. As flores da planta e os seus óleos essenciais, que podem ser extraídos de diferentes espécies, têm sido usados amplamente na indústria cosmética e farmacêutica, demonstrando várias propriedades terapêuticas (SILVA *et al.*, 2015; VERMA *et al.*, 2010), atribuídas principalmente à presença de monoterpenos (SILVA-FLORES *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais apresentam baixa solubilidade em água, devido aos seus compostos lipofílicos e, em geral, são instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor e umidade (SIMÕES *et al.*, 2007). Deste modo, a lipofilicidade, a volatilidade e a sensibilidade a fatores ambientais (WADHWA *et al.*, 2017), dificultam a incorporação em formulações de matrizes aquosas, representando um desafio para os formuladores (SOLANS; SOLÉ, 2012).

O setor cosmético é também muito dinâmico, necessitando, constantemente, de novidades e avanços para atrair seus consumidores, e, por isso, tem aproveitado a expansão da nanotecnologia nos últimos tempos (CHAUDHRI; SONI; PRAJAPATI, 2015). O tamanho reduzido das gotículas, a elevada estabilidade cinética e a transparência óptica, faz da nanoemulsão um sistema de dispersão mais vantajoso em comparação com o sistema emulsionado convencional (SOLANS *et al.*, 2005).

A obtenção de sistemas nanoestruturados pelo método de emulsificação de inversão de fases por composição, além de proporcionar um baixo custo de energia, é importante quando se trata do uso de óleos essenciais, pois não utiliza aquecimento, evitando a perda dos seus compostos voláteis (SOLANS; SOLÉ, 2012). Deste modo, a nanotecnologia surge como estratégia para solucionar a incorporação de substâncias lipofílicas em produtos aquosos, melhorar o desempenho de outros ativos cosméticos e buscar sua aceitação pelo consumidor (DAUDT *et al.*, 2013).

Várias pesquisas têm demonstrado que o óleo essencial de lavanda apresenta atividades biológicas, tais como analgésica, anti-inflamatória, cicatrizante (CARDIA *et al.*, 2018; CAVANAGH; WILKINSON, 2002), antimicrobiana e antifúngica (ASDADI *et al.*, 2016; IMELOUANE *et al.*, 2009). Entretanto, ainda faltam estudos quanto ao seu mecanismo de ação e sua incorporação em sistemas nanoestruturados, motivando a pesquisa e o desenvolvimento de novos ativos e produtos que sejam confiáveis. Assim, é de fundamental importância a realização de estudos que possam, então, comprovar, cientificamente, a segurança e a eficácia do óleo essencial de lavanda, bem como a sua estabilidade, quando presentes em nanoemulsões, o que justifica a realização deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A pele

Considerada o maior órgão do corpo humano, atua como uma barreira de proteção contra o meio ambiente (EPSTEIN; SINGER; CLARK, 1999; JORGE *et al.*, 2008), assegurando que agentes externos, como a radiação ultravioleta (UV) e microrganismos, além de outras agressões mecânicas, químicas e térmicas, não afetem a homeostase do organismo (YUKUYAMA *et al.*, 2016). Representa aproximadamente 5% do peso corporal total (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007) e possui diversos receptores para o tato, pressão, dor e temperatura. Também pode apresentar, dependendo da região corpórea, variações nos valores de espessura e pH, regulado pela secreção das glândulas sudoríparas (TOFETTI; OLIVEIRA, 2006; CORRÊA, 2012).

A pele (Figura 1) é dividida em duas camadas estruturais principais: a camada externa (epiderme) e a camada interna (derme), além do tecido subcutâneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

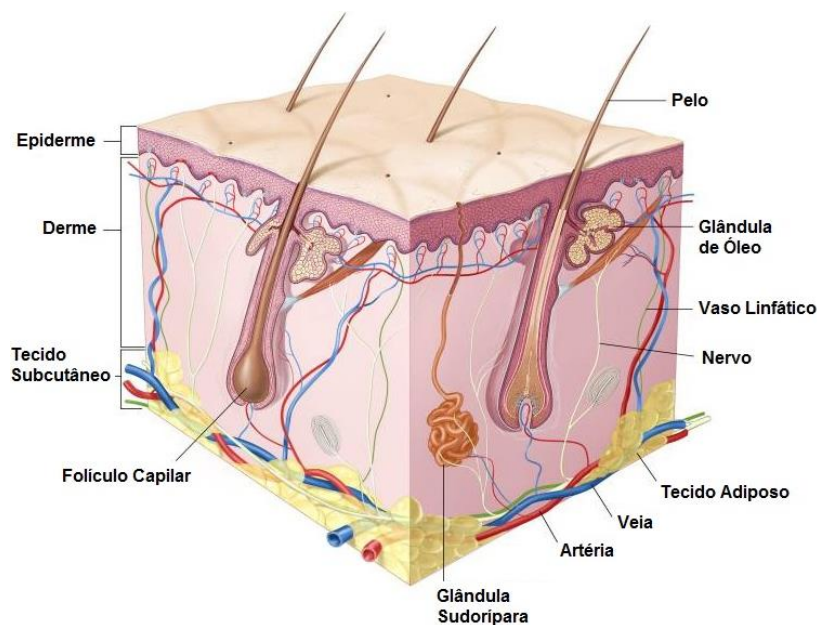


Figura 1. Representação da estrutura da pele humana (Adaptado de PDQ® SCREENING AND PREVENTION EDITORIAL BOARD, 2018).

A epiderme, formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, é a camada mais externa do corpo humano e não apresenta vascularização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). É subdividida em quatro camadas separadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato lúcido e estrato granuloso (CORRÊA, 2012; KATOAKA; AUDI; ZYCHAR, 2016). A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo, composto por corneócitos, células queratinizadas, sem núcleos e sem organelas (CORRÊA, 2012).

A principal função da epiderme é estimular o estrato basal a se multiplicar, renovando o estrato córneo, responsável pela conservação da hidratação cutânea, protegendo a pele da perda excessiva de água, além de controlar a penetração de substâncias externas, funcionando como uma barreira para compostos irritantes. A epiderme também possui funções imunológicas e fornece alguma proteção da pele

contra a luz ultravioleta, através da melanina (CORRÊA, 2012; WICKETT; VISSCHER, 2006).

A renovação epidérmica ocorre constantemente pela transição de queratinócitos do estrato basal, camada mais profunda da epiderme, até o estrato córneo com uma descamação imperceptível (MARIEB; HOEHN, 2009).

A derme é formada por um tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno, elastina, sais minerais, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas, vasos sanguíneos, estruturas nervosas e, principalmente, água (KATOAKA; AUDI; ZYCHAR, 2016). Em função de seus componentes, a derme é dividida em duas camadas de limites poucos distintos: a derme papilar (superficial) e a derme reticular (mais profunda) (AZULAY, 2006). Por possuir pouca predominância celular, é constituída basicamente por fibroblastos, responsáveis pela síntese de macromoléculas que compõem a matriz extracelular, e por células “migratórias”, constituintes do sistema imunológico, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos (CORRÊA, 2012).

O tecido subcutâneo, localizado logo abaixo da derme, consiste principalmente de tecido adiposo, onde os adipócitos estão circundados por um tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Possui as funções de estocar gordura, fornecendo energia através da lipólise de ácidos graxos quando necessário; de atuar como isolante térmico, evitando a perda de calor corporal; e de funcionar como proteção mecânica, amortecendo e suavizando choques (MARIEB; HOEHN, 2009).

2.1.1. Cicatrização

As rupturas às barreiras epiteliais, como a pele, resultam em uma resposta inflamatória que previne a infecção e aumenta a reparação tecidual (MCGEE *et al.*,

2013). A cicatrização é uma sequência contínua e complexa de processos celulares e moleculares, envolvendo componentes da matriz extracelular, células residentes, como os queratinócitos e fibroblastos; leucócitos, neutrófilos, macrófagos/monócitos, linfócitos, assim como mediadores lipídicos e proteicos (HATANAKA; CURI, 2007).

O processo leva à regeneração, reconstituição e restauração proporcional das estruturas lesadas, sendo dividido em três fases principais: inflamação, formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação (ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013). Como a lesão inicial dos tecidos induz dano vascular com hemorragia local, os eventos iniciais da cicatrização estão voltados para o tamponamento dos vasos sanguíneos danificados (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A fase inflamatória é caracterizada basicamente pela presença de células inflamatórias e de inúmeros mediadores químicos no tecido cicatricial. Durante a inflamação, ocorre uma intensificada migração celular através dos capilares, com extravasamento de moléculas séricas, anticorpos e proteínas, sendo controlados pelo aumento do fornecimento de sangue e da permeabilidade capilar, além da vasodilatação (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Na fase fibroblástica e de deposição de matriz extracelular é verificado um predomínio de mecanismos celulares que permitem a produção de uma nova barreira permeável (reepitelização), novos vasos sanguíneos (angiogênese) e reestruturação da integridade da derme (fibroplasia) (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Com a presença local de macrófagos e a produção e liberação contínua de fatores de crescimento fornecidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada, para estimular a angiogênese e a produção de colágeno (fibroplasia).

Deste modo, os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária para suportar o crescimento celular, e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo das células (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; EPSTEIN; SINGER; CLARK, 1999). Ao final dessa fase ocorre a reepitelização, etapa que levará ao fechamento das superfícies da lesão por um novo epitélio e que consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

O remodelamento é a última fase da cicatrização, uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, com a reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz. Compreende etapas sucessivas de produção, digestão e organização das fibrilas de colágeno. Os fibroblastos do tecido de granulação são transformados em miofibroblastos, comportando-se como um tecido contrátil. Simultaneamente, ocorre a reorganização da matriz extracelular, que se transforma de provisória em definitiva. Assim, no decorrer do processo, mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular, os fibroblastos e células inflamatórias deixam o local da ferida. A coloração da cicatriz permanece pálida, uma vez que a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes possuem pouca vascularização devido ao desaparecimento dos neocapilares (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

2.2. Óleos essenciais

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias voláteis com odores característicos, lipofílicos e líquidos à temperatura ambiente, sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário (MACHADO;

FERNANDES JUNIOR, 2011; SIMÕES *et al.*, 2007). Podem ser extraídos de raízes, folhas, flores, cascas, frutos e de outras partes das plantas, geralmente por métodos de destilação, que pode ser simples ou por arraste a vapor (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

São compostos, basicamente, de uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, especialmente mono e sesquiterpenos, além de conter derivados oxigenados, como aldeídos, cetonas, álcoois, éteres, fenóis ou epóxidos. Alguns dos monoterpenos mais comuns encontrados são o linalol, geraniol, limoneno, mirceno e citronelol. Entre os sesquiterpenos mais comuns estão o bisabolol, cariofileno, nerolidol e farneseno (DAGLI *et al.*, 2015; FELIPE; BICAS, 2017; FRANZ, 2010).

A composição química dos OEs entre as diversas espécies de plantas pode variar devido a fatores ambientais e de manejo, bem como da forma de extração e armazenamento (DAGLI *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 2016). Tais metabólitos aparecem em diferentes concentrações sendo que, normalmente, um deles é o componente majoritário, encontrado em alto teor, existindo outros em menores concentrações e alguns em baixíssimas quantidades (traços). Pesquisas demonstram que o óleo essencial, constituído por uma série de substâncias, apresenta uma melhor atividade terapêutica do que suas substâncias isoladas (BAKKALI *et al.*, 2008; ISAAC *et al.*, 2008).

Conhecidos, também, por suas fragrâncias (BUSATO *et al.*, 2014), os OEs podem apresentar propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antivirais, fungicidas, bactericidas, antioxidantes, dentre outras, sendo utilizado em diversas indústrias, como a alimentícia, farmacêutica e cosmética, principalmente na de perfumaria (SILVEIRA *et al.*, 2012b; WADHWA *et al.*, 2017).

2.2.1. Óleo essencial de lavanda

Pertencente à família Lamiaceae, a lavanda ou alfazema é originária das regiões montanhosas do Mediterrâneo, sendo conhecida como uma poderosa erva aromática e medicinal (HAJHASHEMI; GHANNADI; SHARIF, 2003; MSAADA *et al.*, 2012). Compreende 39 espécies, sendo a *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda inglesa) a mais comumente utilizada, embora outras estejam em destaque, como a *Lavandula dentata* L., *L. x intermedia* Emeric ex Loisel., *L. latifolia* Medik. e *L. stoechas* L. (BASCH *et al.*, 2004; TURGUT *et al.*, 2017).

As flores da planta e os seus óleos essenciais, que podem ser extraídos das diferentes espécies por destilação de arraste a vapor, têm sido usados amplamente na indústria cosmética e farmacêutica, demonstrando várias propriedades terapêuticas e atividades biológicas (SILVA *et al.*, 2015; VERMA *et al.*, 2010), atribuídas à presença de monoterpenos, como linalol, cânfora e 1,8-cineol (SILVA-FLORES *et al.*, 2019; WORONUK *et al.*, 2011).

Os extratos e o óleo essencial da *L. angustifolia* (Figura 2), anteriormente *Lavandula officinalis*, apresentam diversos efeitos terapêuticos descritos na literatura, tais como atividades ansiolíticas, antioxidantes, antimicrobianas e antifúngicas (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2012a; SMIGIELSKI *et al.*, 2009). Além disso, vários constituintes do óleo também possuem propriedades farmacológicas, como antidepressivas, anti-inflamatórias e analgésicas (CARDIA *et al.*, 2018; HAJHASHEMI; GHANNADI; SHARIF, 2003; PEANA *et al.*, 2002).

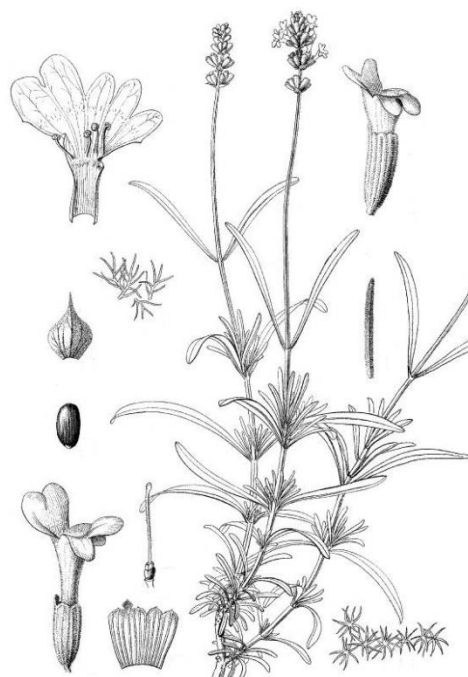


Figura 2. Ilustração retratando partes da *Lavandula angustifolia* (Adaptado de <<http://www.tropicos.org/Image/6334>>).

Um trabalho realizado por Silva *et al.* (2015) constatou a inibição do desenvolvimento de um edema de orelha induzido por óleo de cróton, em ratos da linhagem Wistar, através da administração oral do óleo essencial de lavanda e de sua aplicação tópica, 60 minutos antes da indução.

Há muitos estudos que indicam que *L. angustifolia* contém, principalmente, linalol e acetato de linalila como componentes majoritários (MACHADO, 2013; PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2004; VERMA *et al.*, 2010), apresentando atividade citofilática e podendo ser utilizado como ingrediente ativo em produtos que se destinem a reduzir processos inflamatórios cutâneos, como as queimaduras. Porém, embora o óleo tenha um histórico de uso na cicatrização de feridas, há pouca evidência científica de que a lavanda acelere a cicatrização ou reduza as cicatrizes (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; FARAHPOUR *et al.*, 2015).

Ao contrário da *L. angustifolia*, a literatura reporta como componentes majoritários da *Lavandula dentata* (Figura 3) os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol e cânfora, podendo variar a concentração desses componentes entre as folhas e flores da planta (MASETTO *et al.*, 2011; TOUATI *et al.*, 2011), e conferindo ao seu óleo essencial propriedades medicinais e terapêuticas como ação antiespasmódica, antifúngica e bactericida, além de anti-inflamatória e analgésica (ASDADI *et al.*, 2016; IMELOUANE *et al.*, 2009).



Figura 3. *Lavandula dentata* (LIM, 2014).

Além disso, outros estudos vêm mostrando que vários constituintes do óleo essencial de lavanda também possuem propriedades anticancerígenas e antimutagênicas (IMELOUANE *et al.*, 2010; WORONUK *et al.*, 2011).

Entretanto, devido à natureza alergênica de alguns componentes dos óleos essenciais, bem como sua presença crescente em cosméticos, produtos aromáticos e terapêuticos, e a maior conscientização do consumidor, relatos de dermatite leve e

de fotossensibilização por uso tópico têm gerado preocupações e, portanto, a necessidade de pesquisas futuras voltadas para a compreensão do potencial alergênico dos terpenos comumente empregados, garantindo a segurança do seu uso em função das atividades biológicas e terapêuticas (BASCH *et al.*, 2004; DENNER, 2009; WORONUK *et al.*, 2011).

2.3. Nanotecnologia em cosméticos

A nanotecnologia é uma ciência inovadora dedicada ao desenvolvimento, produção, caracterização e utilização de materiais, dispositivos e sistemas capazes de controlar a forma e o tamanho das partículas e/ou gotículas em escala nanométrica (MONTENEGRO *et al.*, 2016; RAJ *et al.*, 2012), sendo foco de interesse para estudos e inúmeras aplicações práticas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (RIBEIRO *et al.*, 2015; LEONG *et al.*, 2011; PRAKASH; THIAGARAJAN, 2011).

O setor cosmético é muito dinâmico, necessitando constantemente de novidades e avanços para atrair seus consumidores, e, por isso, tem aproveitado o crescimento da nanotecnologia nos últimos tempos (CHAUDHRI; SONI; PRAJAPATI, 2015). Deste modo, a aplicação da nanotecnologia surge como estratégia para melhorar o desempenho de ativos contidos nos cosméticos e sua aceitação pelo consumidor (DAUDT *et al.*, 2013).

Os nanocosméticos são sistemas que veiculam ingredientes nanoestruturados, oferecendo propriedades mais vantajosas em comparação com os sistemas cosméticos convencionais, como as emulsões (LEONG *et al.*, 2011; SINGH; NANDA, 2012).

Há diferentes tipos de nanomateriais empregados em cosméticos (CAO et al., 2016; RAJ *et al.*, 2012). Além das nanoemulsões, outros materiais nanotecnológicos também começaram a ser aplicados em cosméticos, tais como, metais (ouro e prata), óxidos metálicos, lipossomas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanocristais, dendrímeros, cubossomas, niossomas e fulerenos (MU; SPRANDO, 2010).

A Lancôme foi, em 1995, a primeira empresa a inserir internacionalmente um cosmético a base de nanotecnologia, apresentando um creme facial contendo nanocápsulas de vitamina E pura, para peles maduras. No Brasil, a empresa pioneira a desenvolver e colocar no mercado um nanocosmético foi O Boticário, em 2005, com um creme antissinais nanoestruturado para a área dos olhos, testa e lábios, sendo comercializado até hoje. A Natura, por sua vez, lançou somente em 2007 o seu primeiro produto nanotecnológico, um hidratante corporal contendo gotícula da ordem de 150 nanômetros (BARIL *et al.*, 2012; KATOAKA; AUDI; ZYCHAR, 2016).

Entretanto, apesar do mercado ser promissor, ainda é grande a necessidade de discussões e esclarecimentos acerca dessa tecnologia, pois não há transparência e informações suficientes quanto à segurança e aos riscos relacionados à sua utilização (PISCOPO *et al.*, 2015).

2.3.1. Nanoemulsões

Emulsões são sistemas dispersos de um líquido imiscível em outro, estabilizados por um ou mais tensoativos (FRANGE; GARCIA, 2009). Entre elas, destacam-se as nanoemulsões. Além do pequeno tamanho de suas gotículas (MASON *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2015), as nanoemulsões são cineticamente

estáveis, ou seja, não se formam espontaneamente, necessitando da utilização de energia para que o processo de emulsificação ocorra, diferente das microemulsões, que são sistemas termodinamicamente estáveis e requerem elevadas concentrações de tensoativos (ADJONU *et al.*, 2014; McCLEMENTS, 2012).

Embora haja concordância no tamanho submicrométrico em relação ao diâmetro das gotículas, não existe concordância em um intervalo de tamanhos para distingui-las das emulsões convencionais, principalmente por não haver uma mudança drástica nas propriedades físico químicas, quando o diâmetro da gotícula da emulsão diminui da faixa micrométrica para a nanométrica (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

As dimensões mais comuns declaradas na literatura variam de 20 até 500 nm, sendo estabelecidas com base nos critérios ópticos e, muitas vezes, na aplicação pretendida (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SOLANS; SOLÉ, 2012; SOUZA *et al.*, 2011). Deste modo, as nanoemulsões são tipicamente translúcidas a olho nu, com reflexos azulados intensos ou leitosos (Figura 4), e podem reduzir a ocorrência de cremeação, sedimentação e floculação durante o armazenamento, aumentando sua estabilidade física em longo prazo (BAJERSKI *et al.*, 2016; SOLANS *et al.*, 2005; TADROS *et al.*, 2004).

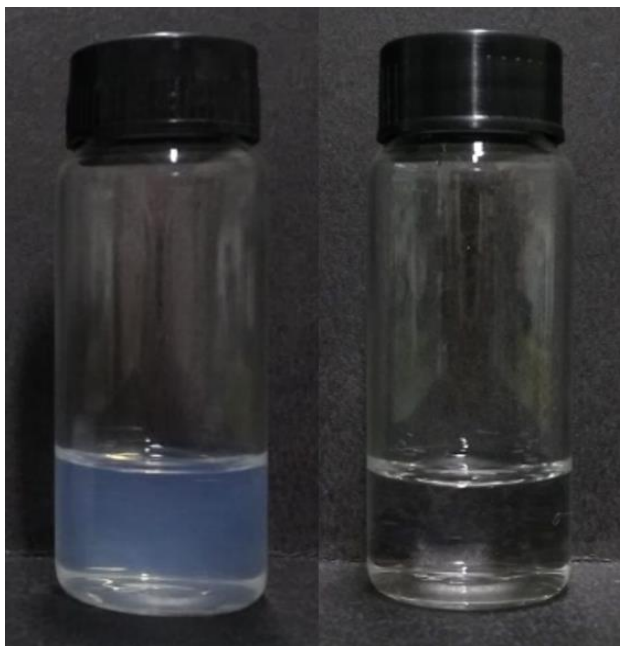


Figura 4. Imagem de uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Lavandula dentata* (esquerda) e água destilada (direita) (Elaborada pela autora).

Com uma das finalidades de aumentar o direcionamento de ativos para as camadas mais profundas da pele, além da possibilidade de liberação controlada de ingredientes nanoestruturados, as nanoemulsões têm se tornado cada vez mais importantes como potenciais veículos em cosméticos (CHAUDHRI; SONI; PRAJAPATI, 2015), sendo encontradas, devido também ao seu aspecto físico, estético e sensorial, em uma grande variedade de produtos cosméticos como hidratantes para o corpo, produtos capilares, preparações antienvelhecimento e maquiagem (DAUDT *et al.*, 2013; MU; SPRANDO, 2010).

2.3.1.1. Métodos de obtenção

O método de obtenção é muito importante para a formação e estabilidade dos sistemas nanoemulsionados, pois como não se formam espontaneamente, é necessário o fornecimento de energia. De acordo com a literatura, podem ser

preparados por métodos de alto ou baixo consumo de energia (SOLANS *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2011).

As abordagens de alta energia utilizam dispositivos mecânicos (microfluidizadores, homogeneizadores de alta pressão ou métodos ultrassônicos) que geram forças intensas capazes de formar gotículas de óleo muito finas, elevando os custos do processo (RIBEIRO *et al.*, 2015; FERNANDEZ *et al.*, 2004). Os métodos de baixa energia fazem uso de características intrínsecas do sistema, muitas vezes envolvendo inversão de fase (OLIVEIRA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2011).

As técnicas de inversão de fase mais comuns estão associadas a transições de fase induzidas por mudança de temperatura (*Phase Inversion Temperature* - PIT) ou composição (*Phase Inversion Composition* - PIC) (SOLANS; SOLÉ, 2012). Há também os métodos de energia espontânea, que envolvem a utilização de solventes orgânicos voláteis, mas por serem potencialmente tóxicos, não são considerados "eco-friendly" (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Uma vez que as fases envolvidas no processo de emulsão são determinantes para obter nanoemulsões com tamanho mínimo de gotícula e baixa polidispersão, o conhecimento sobre o comportamento do tensoativo se torna importante quando estes métodos de emulsificação são usados. O método PIT é baseado na mudança da curvatura espontânea do tensoativo, induzida pela temperatura, afetando o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) (SOLE *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011). No método PIC, as transições de fase são induzidas por alterações na composição durante a emulsificação, à temperatura constante. O procedimento consiste em adicionar progressivamente a água sobre o óleo e uma mistura de tensoativos em

agitação, ou vice-versa, sendo essa mistura composta por um tensoativo lipofílico e outro hidrofílico (SOLANS; SOLÉ, 2012).

2.3.1.2. Métodos de caracterização

Devido a algumas propriedades físicas que as nanoemulsões possuem e que as distinguem das emulsões comuns, a caracterização é uma necessidade para a avaliação de sua qualidade e segurança (RAJ *et al.*, 2012). O tamanho das gotículas é afetado por vários fatores, como a composição da formulação, do método de obtenção e das condições de produção. O aumento das gotículas durante o armazenamento é um indicativo de instabilidade da formulação e, conseqüentemente, da baixa qualidade do produto (LOVELYN; ATTAMA, 2011; MARCATO, 2009; MASON *et al.*, 2006).

Os parâmetros mais importantes que devem ser considerados na caracterização, principalmente devido ao seu efeito sobre a estabilidade, são a morfologia e o tamanho da gotícula, o índice de polidispersão e o potencial Zeta (carga de superfície). Além dos parâmetros físicos, a realização de permeação cutânea *in vitro* (MONTENEGRO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017) pode auxiliar na caracterização de uma nanoemulsão.

Várias técnicas têm sido utilizadas para a caracterização de sistemas nanoestruturados. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitem visualizar imagens diretas das nanopartículas, possibilitando a determinação da sua morfologia e da presença de estruturas lamelares (MARCATO, 2009; MONTENEGRO *et al.*, 2016).

O tamanho das gotículas e o potencial Zeta podem ser medidos por Espectroscopia de Correlação de Fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* - PCS).

Esta técnica também avalia o índice de polidispersão, derivado da análise cumulativa do Espalhamento de Luz Dinâmica (*Dynamic Light Scattering* - DLS), proporcionando uma amplitude da distribuição do tamanho das gotículas e indicando a qualidade e homogeneidade da dispersão (LOVELYN; ATTAMA, 2011; MASON *et al.*, 2006).

2.3.1.3. Vantagens das nanoemulsões

Muitos ativos pesquisados atualmente são compostos instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo a degradação do produto (DAUDT *et al.*, 2013). O pequeno tamanho das gotículas, a elevada estabilidade cinética e a transparência óptica das nanoemulsões, proporcionam vantagens para a sua utilização em muitas aplicações tecnológicas (SOLANS *et al.*, 2005).

Sistemas nanoemulsionados possuem área de superfície maior que a das macroemulsões, sendo adequados para a entrega eficiente de ingredientes ativos através da pele. Além de permitir que as substâncias sejam depositadas uniformemente nos substratos, as nanoemulsões promovem o aumento da solubilidade de ativos, e, em alguns casos, apresentam maior permeabilidade (ADJONU *et al.*, 2014; LOVELYN; ATTAMA, 2011).

O tamanho reduzido das gotículas reduz o alcance de forças atrativas que atuam entre elas, impedindo qualquer floculação, coalescência ou sedimentação que possam ocorrer durante o armazenamento. O movimento Browniano constante entre as gotículas também proporciona um aumento da estabilidade contra a separação induzida gravitacionalmente (MASON *et al.*, 2006; THAKUR *et al.*, 2012). E, ao contrário das microemulsões que requerem uma alta concentração de tensoativos,

geralmente na faixa de 20% ou mais, as nanoemulsões podem ser preparadas usando uma concentração mais baixa, podendo ser suficiente de 5 a 10% (LOVELYN; ATTAMA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Devido a essas vantagens, as nanoemulsões têm sido utilizadas para veicular ativos de origem vegetal. Além disso, podem melhorar a estabilidade de várias matérias-primas cosméticas, como ácidos graxos insaturados, vitaminas ou antioxidantes encapsulados dentro das nanopartículas, proporcionando a esses compostos uma maior eficácia, aspecto atrativo e sensorial mais agradável (GANESAN; CHOI, 2016; MU; SPRANDO, 2010).

2.3.2. Segurança de nanomateriais

Apesar do uso de nanomateriais em produtos cosméticos apresentar muitas vantagens e ser impulsionado por um crescimento mercadológico potencial, alguns aspectos, como sua segurança ainda é um tema bastante controverso (KATZ; DEWAN; BRONAUGH, 2015; MELO *et al.*, 2015).

Uma compreensão da interação dos nanomateriais com o meio ambiente em combinação com a compreensão da via de exposição fornecerá informações úteis sobre o destino biológico das nanopartículas e sua toxicidade. Por exemplo, a penetração de nanopartículas através da pele, sua biodistribuição, taxa de excreção e toxicidade são determinadas pelas características das nanopartículas como: forma, tamanho, carga superficial, composição da superfície, revestimento, tipo de materiais e outros componentes presentes nas nanoemulsões (MU; SPRANDO, 2010).

Como há diferentes tipos de nanomateriais empregados em cosméticos, além das nanoemulsões, como nanocápsulas, lipossomas, nanopartículas lipídicas

sólidas, entre outros, as preocupações com a segurança de nanocosméticos aumentaram, e forçaram as indústrias cosméticas a limitar o uso dessa nanotecnologia, além de passar por uma avaliação completa de segurança antes de entrarem no mercado (RAJ *et al.*, 2012).

A expansão na comercialização e uso de produtos cosméticos com nanotecnologia exige esforços internacionais para acelerar a padronização de estudos e métodos de avaliação dos efeitos tóxicos sobre a saúde humana e ambiental. Embora tenha havido um grande avanço em estudos acerca da nanotoxicidade e da nanosseguurança, muitos efeitos tóxicos dos materiais nanotecnológicos ainda são especulados, exigindo avaliação mais precisa do seu impacto na saúde e no meio ambiente, principalmente considerando seus efeitos em longo prazo (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi a caracterização química dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata*, ensaios *in vitro* e aplicação em nanoemulsões.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os OEs das espécies *L. angustifolia* e *L. dentata*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos OEs das espécies *L. angustifolia* e *L. dentata*;
- Avaliar a citotoxicidade dos OEs das espécies *L. angustifolia* e *L. dentata*, em diferentes linhagens celulares;
- Avaliar o estímulo da produção de colágeno *in vitro* dos OEs das espécies *L. angustifolia* e *L. dentata*;
- Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo OEs das espécies *L. angustifolia* e *L. dentata*;
- Avaliar a estabilidade física das formulações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das espécies *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata* foram extraídos de todas as partes de cada planta e fornecidos, conforme o laudo apresentado (Anexo 1), pelo O Lavandário - Cultivo de Lavanda e Ervas Aromáticas - Ind. e Comércio Ltda. - EPP, localizado na cidade de Cunha, São Paulo, junto às coordenadas 23° 04' 28" Sul e 44° 57' 35" Oeste.

4.2. Caracterização química dos óleos essenciais

A identificação dos constituintes voláteis dos dois óleos essenciais de lavanda foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massas (CG-EM - USD434016H - Agilent Technologies), usando detector de massas com ionização por impacto de elétrons (70 eV). Foi diluído 1 mg de cada amostra em hexano (1:100 mg/ μ L) e injetado 1 μ L dessa diluição em coluna DB-5MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 μ m) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As amostras dos óleos essenciais foram submetidas às seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção, 260°C; temperatura do detector, 290°C; gás de arraste Hélio com fluxo de 1 mL/min e modo de injeção *split* com razão 1:10. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 60°C e posteriormente elevada, gradualmente, até 290°C utilizando rampa de aquecimento de 5°C/min (CORRÊA, 2017).

O índice de retenção (IR) das substâncias foi calculado através da interpolação do tempo de retenção de uma mistura padrão de carbonos alifáticos (C₉-C₃₀) (Sigma[®]), analisada nas mesmas condições que as amostras. Os

componentes foram identificados por comparação do IR e espectros de massas descritos na literatura (ADAMS, 2017).

A quantificação relativa das substâncias, presentes nos óleos essenciais, foi realizada pelo método de normalização das áreas, de cada um dos sinais dos cromatogramas obtidos, por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC), utilizando as mesmas condições cromatográficas que em CG-EM.

4.3. Avaliação do potencial antioxidante

4.3.1. Metodologia de inibição do radical DPPH•

A avaliação do potencial antioxidante dos óleos essenciais de lavanda foi determinada pela sua capacidade de remoção do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•), segundo metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001) e Chiari *et al.* (2014), com modificações.

Soluções de óleos essenciais foram preparadas em metanol nas concentrações de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21% (v/v). Em tubos, foram pipetados 1 mL das amostras com 2,5 mL de uma solução de radical DPPH• a 0,004%, em metanol, à temperatura ambiente. As amostras foram mantidas na ausência de luz, por 30 minutos, e, logo após, as absorbâncias foram determinadas a 515 nm em espectrofotômetro (SPECTROstar Nano - BMG Labtech).

O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração, utilizando metanol como branco. A solução de controle negativo foi preparada misturando 1 mL de metanol com 2,5 mL da solução de radical DPPH• a 0,004%.

Uma curva de inibição de radicais livres (%) *versus* concentração de óleo essencial foi construída e usada para calcular a concentração de óleo essencial para

inibir 50% de radicais livres nas soluções (EC₅₀). O ensaio também foi realizado para o ácido gálico, um padrão antioxidante, como controle positivo, em diferentes concentrações.

A atividade antioxidante, expressa como a porcentagem de inibição do radical DPPH•, foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de Inibição de DPPH} = \frac{(Abs_{Controle\ negativo} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Controle\ negativo}} \times 100$$

4.3.2. Metodologia de inibição do radical ABTS•+

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de lavanda pela inibição do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•+) foi avaliada segundo a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2007).

O radical ABTS•+ foi preparado a partir da reação de 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi mantida ao abrigo de luz, à temperatura ambiente, por 16 horas.

Soluções de óleos essenciais foram preparadas em metanol nas concentrações de 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27% (v/v).

Para avaliação da atividade antioxidante, a solução de radical ABTS•+ foi diluída em etanol até obter uma absorbância de 0,700 ± 0,05 quando medida em espectrofotômetro, a 734 nm. Em seguida, 3 mL da solução do radical ABTS•+ foram adicionados a 30 µL de cada solução dos óleos em tubos de ensaio. Após 6 minutos, a absorbância das amostras foi determinada a 734 nm, em espectrofotômetro.

Os valores de EC₅₀ foram calculados pela mesma equação utilizada na avaliação da atividade antioxidante pela metodologia de inibição do radical DPPH• (CASTRO *et al.*, 2018).

O mesmo procedimento também foi realizado utilizando o trolox, como padrão antioxidante, nas concentrações de 100 a 2.000 µM.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pela metodologia que utiliza o corante vital methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) (CHIARI *et al.*, 2012a; MOSMANN, 1983).

As células das linhagens HaCat, HDFa e HepG2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibiótico, em uma atmosfera umidificada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO₂, em garrafas próprias para o cultivo de células.

Após atingir a quantidade necessária de células, foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a viabilidade celular.

As garrafas contendo as células foram tripsinizadas, o seu conteúdo foi colocado em tubos estéreis e centrifugado por três minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em meio de cultura. Em seguida, com a utilização do teste de exclusão pelo azul de tripano (STROBER, 2015), foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo que a concentração padronizada para os experimentos foi de 5×10^5 células/mL.

A suspensão de células foi plaqueada em microplaca de 96 poços com fundo chato, para onde foram transferidos 100 µL da suspensão de células para cada

poço. Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas, para posterior tratamento.

Antes de realizar o tratamento, as microplacas foram observadas em microscópio invertido para garantir que não houve contaminação. Foram preparadas duas soluções estoque com 5% de cada óleo essencial de lavanda, em etanol, para a solubilização dos óleos no meio de cultura, suplementado com 5% de soro fetal bovino (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Então, para controle, foi realizado também o teste de citotoxicidade com o etanol nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização e os valores obtidos foram descontados da citotoxicidade dos óleos (CHIARI *et al.*, 2014). As concentrações utilizadas foram obtidas através de diluição seriada, em *ependorfs* estéreis, totalizando 6 concentrações, que variaram de 0,156 a 5% (v/v).

Foi retirado o meio de cultura das microplacas e adicionados os tratamentos, correspondendo a 100 μL de cada concentração de cada OE, nos poços correspondentes. Os controles utilizados foram: negativo (meio sem soro) e positivo (DMSO a 10%), diluídos em meio de cultura suplementado com 5% de soro fetal bovino. As microplacas foram incubadas, novamente, em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas.

Após as 24 horas, os tratamentos foram retirados das microplacas, que foram lavadas com 100 μL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Foram adicionados 100 μL da solução de MTT em PBS (1 mg/mL) em cada poço. As microplacas foram incubadas por 3 horas em estufa na presença de 5% de CO_2 , a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, foi retirada a solução de MTT e foram adicionados 100 μL de álcool isopropílico em cada poço das microplacas. Em seguida, foi realizada uma leve agitação e verificação da solubilização dos cristais de formazana. As absorbâncias

foram avaliadas em leitor de microplacas SPECTROstar Nano - BMG Labtech, a 595 nm (Figura 5).

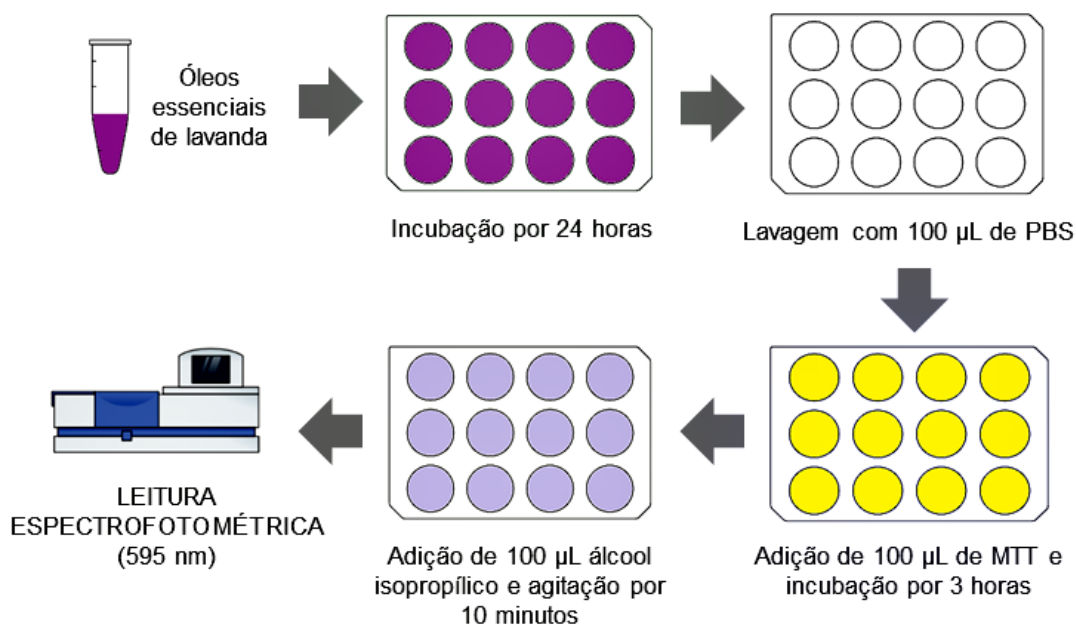


Figura 5. Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais de lavanda (Elaborado pela autora: <www.mindthegraph.com>).

Através das absorvâncias obtidas pode ser calculada a porcentagem de células mortas em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang *et al.* (2004) e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células viáveis e o EC₅₀, conforme as fórmulas descritas a seguir, onde:

$$\% \text{ células mortas} = \frac{(Abs_{Cn} - Abs_{Am})}{Abs_{Cn}} \times 100$$

Abs_{Cn} = absorvância do controle negativo;

Abs_{Am} = absorvância da amostra.

$$\% \text{ células viáveis} = 100 - \% \text{ células mortas}$$

Os ensaios foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

4.5. Avaliação da produção de colágeno

Para a avaliação da capacidade dos óleos essenciais de lavanda em estimular a biossíntese de colágeno, foram utilizadas células HDFa cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibiótico, em uma atmosfera umidificada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 .

Após atingir a quantidade necessária para o ensaio, as células foram plaqueadas em microplaca de 96 poços com fundo chato. Foram transferidos 100 μL de uma suspensão de células para cada poço, padronizada em uma concentração de 1×10^6 células/mL. Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas, para garantir a adesão das células à placa e posterior tratamento.

Foram preparadas duas soluções estoque com 0,5% de cada óleo essencial de lavanda, em etanol, para a solubilização no meio de cultura sem soro fetal bovino. Diferentes concentrações, dos óleos e do solvente, foram obtidas através de diluição seriada, em *ependorfs* estéreis, totalizando 8 concentrações, que variaram de 0,003 a 0,5% (v/v).

Após as 24 horas, o meio de cultura foi retirado das microplacas e os tratamentos, correspondendo a 100 μL de cada concentração de cada OE, foram adicionados nos poços correspondentes. Além destes tratamentos, as células

também foram mantidas apenas com meio de cultura, o que foi denominado de controle negativo. As microplacas foram incubadas, novamente, em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas.

O procedimento para quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos foi iniciado no terceiro dia, de acordo com Wirohadidjojo *et al.* (2012).

Os tratamentos foram retirados e a microplaca foi lavada com 100 μL de PBS. Foram adicionados 200 μL da solução de Boiun em cada poço, para fixar o material. Após 1 hora, a solução foi descartada e a microplaca lavada com água deionizada, até a remoção completa da cor do sobrenadante. A microplaca foi vertida sobre papel absorvente para a retirada de toda umidade e mantida à temperatura ambiente *overnight* para completa secagem.

No quarto dia, foram adicionados 200 μL da solução do corante Sirius Red (Direct Red 80, Sigma-Aldrich) em cada poço, e a microplaca foi mantida em agitação por 1 hora, na ausência de luz, em um agitador de placas Compact ROCKER CR95 - FINEPCR. O sobrenadante foi removido e a microplaca foi lavada, por quatro vezes, com 200 μL de ácido clorídrico a 0,1 M para completa remoção da cor do sobrenadante.

Em seguida, foram adicionados 200 μL de hidróxido de sódio a 0,5 M em cada poço. A microplaca foi, novamente, mantida em agitação por 1 hora, para completa solubilização das fibras colágenas (previamente coradas com Sirius Red), e as absorbâncias foram avaliadas em leitor de placas a 550 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para determinar a concentração de colágeno promovida por cada OE, uma curva (concentração de colágeno versus absorbância) foi construída.

Diferentes concentrações de colágeno tipo I (0 a 500 µg/mL) foram preparadas em ácido acético 0,2%. Estas concentrações foram adicionadas em uma microplaca de 96 poços e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa úmida, por 24 horas. Para completa secagem, a microplaca foi transferida para uma estufa seca a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Por fim, o mesmo procedimento realizado para a coloração do colágeno produzido pela cultura celular, foi reproduzido na microplaca contendo as soluções do padrão de colágeno tipo I.

4.6. Desenvolvimento das nanoemulsões

As nanoemulsões aquosas, contendo óleos essenciais de lavanda, foram preparadas de acordo com o método de inversão de fases por composição (*Phase Inversion Composition* - PIC), sob temperatura ambiente, para prevenção da perda de substâncias voláteis durante o processo de preparação.

4.6.1. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)

Através da utilização dos diferentes tensoativos não iônicos, Sorbitan Oleate (EHL = 4,3) e Polysorbate 20 (EHL = 16,7), misturados em diferentes proporções, uma ampla faixa de valores de EHL foi obtida, variando de 4,3 a 16,7. O EHL resultante de cada mistura dos tensoativos foi determinado com base na fórmula a seguir, onde:

$$EHL_r = \frac{EHL_A \times A\% + EHL_B \times B\%}{100}$$

EHL_r = valor de EHL requerido da mistura dos dois tensoativos

EHL_A = valor de EHL do tensoativo hidrofílico

EHL_B = valor de EHL do tensoativo lipofílico

A% = percentual do tensoativo A na mistura de tensoativos

B% = percentual do tensoativo B na mistura de tensoativos

$A\% + B\% = 100$

Cada formulação foi preparada com uma massa final de 5 g, contendo 90% de água destilada, 5% de óleo essencial e 5% da mistura de tensoativos (FERNANDES et al., 2013). O óleo e os tensoativos foram agitados a 800 rpm usando um agitador magnético FANEM[®] - Modelo 258, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada água destilada e a mistura foi agitada por mais 60 minutos (Figura 6) (DUARTE et al., 2015). O valor de EHL requerido de cada óleo foi determinado por análise macroscópica, como formação de precipitado, cremeação e separação de fases.



Figura 6. Estrutura utilizada para o desenvolvimento das nanoemulsões (Elaborada pela autora).

4.6.2. Determinação da porcentagem dos componentes para obtenção do mesmo EHL

Para este estudo, a mistura de tensoativos que resultou no valor de EHL requerido da fase oleosa foi mantida constante. Através de composições anteriormente descritas na literatura e comumente utilizadas na obtenção de nanoemulsões, formulações com diferentes proporções dos componentes foram preparadas. A composição que permitiu a determinação do valor de EHL foi usada como ponto de partida (90% de água destilada, 5% de óleo essencial e 5% da mistura de tensoativos), e o tamanho de gotícula, assim como o índice de polidispersão e o potencial Zeta, foi determinado (FERNANDES *et al.*, 2014).

4.6.3. Determinação dos tensoativos

A fim de avaliar o comportamento e melhorar a estabilidade das formulações, foram utilizados outros tensoativos em diferentes misturas, sendo mantido o valor do EHLr e a porcentagem dos componentes determinada anteriormente para cada óleo. O Sorbitan Oleate (EHL = 4,3) também foi mantido como tensoativo lipofílico, e foram utilizados o Polysorbate 80 (EHL = 15) e o PPG-5-Ceteth-20 (EHL = 16) como tensoativos hidrofílicos. Além destes, foi testado sozinho outro tensoativo líquido, o Caprylyl/Capryl Glucoside, Aqua, Polyglyceryl-3 Cocoate, Polyglyceryl-10 Laurate, Citric Acid (Resassol® Apostrophie) da Res Pharma, doado pela Innovasell.

As formulações obtidas foram submetidas à análise macroscópica e a centrifugação, 24 horas após o preparo, e avaliadas quanto ao tamanho de gotícula, o índice de polidispersão e o potencial Zeta, para posterior avaliação de estabilidade.

4.6.3.1. Centrifugação

As formulações (5 g), após 24 horas de preparo, foram submetidas a 3.000 rpm durante 30 minutos (CENTRIBIO) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (BRASIL, 2004).

4.6.4. Distribuição do tamanho de gotícula e potencial Zeta

As nanoemulsões foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, através da utilização de um Zetasizer Nano ZS - Malvern. Cada análise foi realizada mediante a diluição das formulações com água destilada (1:25) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.7. Avaliação da estabilidade física das formulações

As nanoemulsões consideradas estáveis, segundo a análise macroscópica e a centrifugação, foram acondicionadas em frascos de vidro fechados e submetidas aos testes de estabilidade acelerada. As formulações foram avaliadas 24 horas após seu preparo e 10, 14, 21 e 30 dias após exposição a diferentes condições de temperatura: temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e estufa ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) (BRASIL, 2004). Foram utilizados como parâmetros avaliativos da estabilidade:

Análise macroscópica: observação da formação de precipitado, cremeação e separação de fases nas formulações (DUARTE *et al.*, 2015).

Determinação do valor do pH: em um béquer foram adicionados 1,0 g da amostra e 10,0 g de água destilada, homogeneizados e determinado o valor do pH, inserindo o eletrodo (pHmetro PG1800 - GEHAKA) diretamente na amostra diluída, à temperatura ambiente (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008). As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Distribuição do tamanho de gotícula e potencial Zeta: conforme descrito no item 4.6.4.

4.8. Análise estatística dos resultados

A análise estatística e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o programa Excel 2010. Foram determinados a média e desvio padrão, além da análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando adequado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados por CG-EM e CG-DIC para identificar e quantificar seus constituintes.

No óleo essencial da *L. angustifolia* foram identificados 21 constituintes (71,6%). Foi verificada a presença dos compostos majoritários 1,8-cineol (20,1%), cânfora (18,2%), α -terpineol (5,6%), linalol (5,1%) e α -bisabolol (4,8%), que corresponderam a 53,8% da composição do óleo.

A Tabela 1 apresenta as substâncias do OE da *L. angustifolia* dispostas em sequência crescente de eluição, e os cromatogramas CG-EM e CG-DIC podem ser encontrados nos Apêndices 1 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Constituintes químicos (%) do óleo essencial da *L. angustifolia*

TR (min) ^a	Substância	IR _{exp} ^b	IR _{lit} ^c	AR % ^d	Identificação ^e
5,16	α -pinene	933	932	1,8	RL MS
5,51	Camphene	948	946	0,7	RL MS
6,12	Sabinene	973	969	0,4	RL MS
6,23	β -pinene	978	974	1,8	RL MS
6,55	Myrcene	991	988	0,3	RL MS
7,87	1,8-cineole	1033	1026	20,1	RL MS
7,98	(Z)- β -ocimene	1036	1032	0,1	RL MS
9,73	Fenchone	1089	1083	0,8	RL MS
10,13	Linalool	1101	1095	5,1	RL MS
11,63	<i>Trans</i> -pinocarveol	1139	1135	2,1	RL MS
11,85	Camphor	1145	1141	18,2	RL MS
12,70	<i>Cis</i> -chrysanthenol	1166	1160	2,7	RL MS
13,13	Terpinen-4-ol	1177	1174	1,5	RL MS
13,67	α-terpineol	1191	1186	5,6	RL MS
13,89	Myrtenal	1197	1195	0,4	RL MS
17,56	Bornyl acetate	1286	1284	0,7	RL MS
21,42	Daucene	1380	1380	1,3	RL MS
23,01	(E)-caryophyllene	1419	1417	1,1	RL MS
23,68	α - <i>trans</i> -bergamotene	1436	1432	1,0	RL MS
26,77	γ -cadinene	1514	1513	1,0	RL MS
33,17	α-bisabolol	1685	1685	4,8	RL MS
	Total			71,6	

^a Tempo de retenção determinado na coluna capilar DB-5MS; ^b IR_{exp}: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcanos (C₉-C₃₀) na coluna DB-5MS; ^c IR_{lit}: Índice de retenção da literatura; ^d AR: Área relativa (área do pico em relação à área total dos picos no cromatograma CG-DIC); ^e RL: Comparação do IR_{exp} com a literatura; MS: Comparação dos espectros de massa com a literatura.

Entre os 12 constituintes (76,6%) identificados no óleo essencial da *L. dentata*, foi verificada a presença dos compostos majoritários 1,8-cineol (30,4%), cânfora (12,3%), fenchone (10,2%), endo-fenchol (5,7%) e β -pineno (4,9%), que corresponderam a 63,5% da composição do óleo.

A Tabela 2 apresenta as substâncias do OE da *L. dentata* dispostas em sequência crescente de eluição, e os cromatogramas CG-EM e CG-DIC podem ser encontrados nos Apêndices 2 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Constituintes químicos (%) do óleo essencial da *L. dentata*

TR (min) ^a	Substância	IR _{exp} ^b	IR _{lit} ^c	AR % ^d	Identificação ^e
5,15	α -pinene	933	932	3,7	RL MS
5,51	Camphene	948	946	1,1	RL MS
6,12	Sabinene	973	969	1,1	RL MS
6,22	β-pinene	977	974	4,9	RL MS
7,58	<i>o</i> -cymene	1024	1022	1,4	RL MS
7,85	1,8-cineole	1032	1026	30,4	RL MS
9,75	Fenchone	1089	1083	10,2	RL MS
10,13	Linalool	1101	1095	2,5	RL MS
10,66	Endo-fenchol	1114	1114	5,7	RL MS
11,85	Camphor	1145	1141	12,3	RL MS
12,69	3-Thujanol	1166	1164	1,2	RL MS
27,90	Hedycaryol	1544	1546	2,1	RL MS
	Total			76,6	

^a Tempo de retenção determinado na coluna capilar DB-5MS; ^b IR_{exp}: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcanos (C₉-C₃₀) na coluna DB-5MS; ^c IR_{lit}: Índice de retenção da literatura; ^d AR: Área relativa (área do pico em relação à área total dos picos no cromatograma CG-DIC); ^e RL: Comparação do IR_{exp} com a literatura; MS: Comparação dos espectros de massa com a literatura.

Verma *et al.* (2010) identificou acetato de linalila (47,56%), linalol (28,06%), acetato de lavandulila (4,34%) e α -terpineol (3,75%) como os principais componentes do óleo essencial das inflorescências da *L. angustifolia* cultivada na Índia. Turgut *et al.* (2017) determinou linalol (42,3%), acetato de linalila (23,1%) e α -terpineol (4,9%), por análise de CG-EM, como os constituintes em maiores concentrações presentes no OE das flores da *L. angustifolia* cultivada na Turquia.

Os principais compostos também encontrados no OE das flores da *L. angustifolia*, cultivada na Polônia, foram linalol (24,9%), acetato de linalila (18,0%) e borneol (6,3%) (SMIGIELSKI *et al.*, 2009).

Para a *L. angustifolia* cultivada no sul do Brasil, Machado *et al.* (2013) também identificou, como componentes majoritários, o linalol e o acetato de linalila, sendo esta análise realizada com o óleo essencial das inflorescências, extraído por hidrodestilação, e analisado quanto a sua composição por CG-EM, em dois anos de colheita. Porém, Mantovani *et al.* (2013) determinou borneol (22,4%), epi- α -muurolool (13,4%), α -bisabolol (13,1%), precoceno I (13,0%) e eucaliptol (7,9%) como os principais constituintes do OE da *L. angustifolia* cultivada no sudeste do Brasil, assim como Shokri *et al.* (2017), que também encontrou diferentes constituintes majoritários para a *L. angustifolia* cultivada no Irã: 1,8-cineol (22,29%), linalol (11,22%), cânfora (7,88%), β -pineno (5,78%), α -terpineol (4,85%), α -pineno (4,56%), terpina-4-ol (4,19%) e borneol (4,03%).

Em geral, a composição química qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais pode diferir entre as folhas e flores e as diferentes regiões de origem da mesma espécie. Esta tendência traduz a complexidade do metabolismo secundário das plantas (TOUATI *et al.*, 2011), pois como os metabólitos secundários

representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente, suas sínteses são frequentemente afetadas pelas condições ambientais.

Assim, variações no conteúdo total e/ou nas proporções relativas de metabólitos secundários em plantas podem ocorrer dependendo da temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, sazonalidade, altitude, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento e idade, nutrientes do solo, composição atmosférica e dano tecidual, comprovando que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), o que pode ser observado na identificação dos compostos majoritários do OE da *L. angustifolia* estudado neste trabalho, sendo 1,8-cineol e cânfora os principais constituintes, diferindo de vários resultados encontrados na literatura.

Um estudo realizado por Masetto *et al.* (2011) verificou que o teor e a composição química do OE das inflorescências de *L. dentata* estão associados aos estágios de desenvolvimento floral da espécie e época de colheita, podendo observar elevados teores de 1,8-cineol nas flores senescentes colhidas em abril, e elevados teores de cânfora nos botões colhidos em janeiro.

Imelouane *et al.* (2010) identificou β -pineno (30,06%), pinocarveol (8,59%), α -pineno (8,38%), myrtenal (6,81%) e 1,8-cineol (5,47%) como principais constituintes do OE da *L. dentata*. Porém, Silva-Flores *et al.* (2019) identificou como substâncias majoritárias 1,8-cineol (68,59%) e β -pineno (11,53%). Touati *et al.* (2011) também caracterizou os componentes químicos do OE de folhas da *L. dentata*, identificando, como majoritários, 1,8-cineol (33,54%) e cânfora (18,9%). Desta forma, os resultados encontrados na literatura corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, apresentando 1,8-cineol, cânfora e β -pineno como os principais constituintes do óleo essencial da *L. dentata*.

5.2. Avaliação do potencial antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de lavanda foi realizada por duas metodologias, permitindo uma melhor compreensão dos resultados.

Entre as metodologias empregadas, as que utilizam os radicais livres sintéticos DPPH• e ABTS•+ recebem destaque, pela facilidade de execução e pela boa correlação com as demais metodologias antioxidantes (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011). Cada ensaio avalia a capacidade antioxidante sob diferentes condições experimentais e cinéticas, pois as atividades dos compostos em relação aos radicais eliminadores dependem fortemente do ensaio empregado. (CASTRO *et al.*, 2018; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011). Portanto, os resultados foram complementares.

5.2.1. Atividade de inibição do radical DPPH•

A capacidade antioxidante dos óleos essenciais da *L. angustifolia* e da *L. dentata* foi analisada, inicialmente, pela metodologia de inibição do radical DPPH•. A molécula de DPPH é um radical livre estável, apresentando coloração violeta e banda de absorção em torno de 515 nm. Quando uma solução de substâncias, que possuem atividade antioxidante, é misturada a uma solução contendo o radical DPPH•, ocorre uma mudança na coloração, pois o radical reage com as substâncias, recebendo uma hidroxila, e é apresentado na solução em sua forma reduzida, possuindo coloração amarelada (CHIARI *et al.*, 2014; MOLYNEUX, 2004).

Foram avaliadas, primeiramente, soluções de diferentes concentrações (0 a 2 µg/mL) de ácido gálico, substância padrão com atividade antioxidante. Com os

resultados obtidos, foi possível obter uma curva analítica do ácido gálico para certificar que o método foi efetivo na determinação da atividade antioxidante (Figura 7) e, também, para comparar o potencial antioxidante dos óleos com o de uma substância padrão com atividade antioxidante.

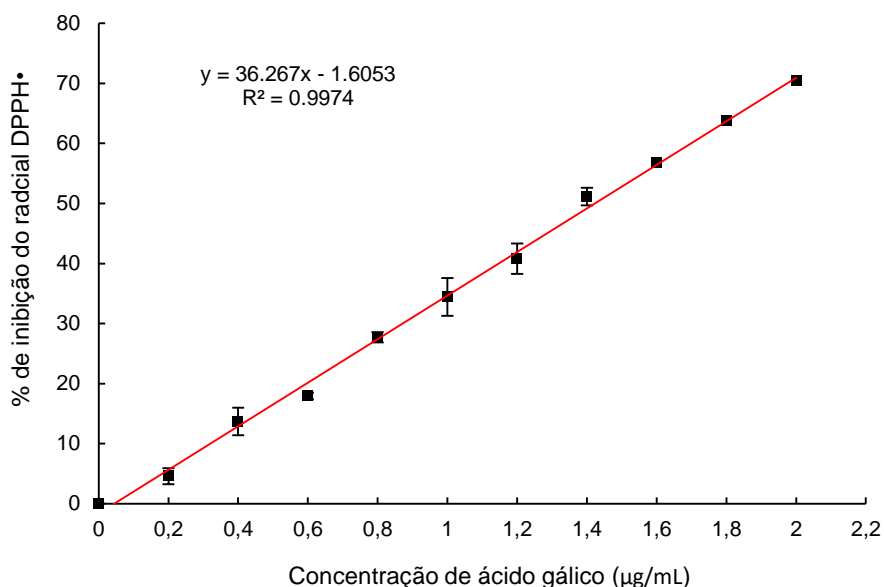


Figura 7. Porcentagem de inibição do radical DPPH• pelo ácido gálico.

A partir da equação da reta obtida foi possível calcular o valor de EC_{50} correspondente à quantidade de ácido gálico necessária para inibir 50% dos radicais DPPH• em solução. O valor de EC_{50} obtido foi 1,42 µg/mL.

Em seguida, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações de cada óleo essencial de lavanda (0 a 21%), e obtida uma curva analítica da concentração de óleo da *L. angustifolia* (Figura 8) e da *L. dentata* (Figura 9) frente à porcentagem de inibição do radical DPPH•.

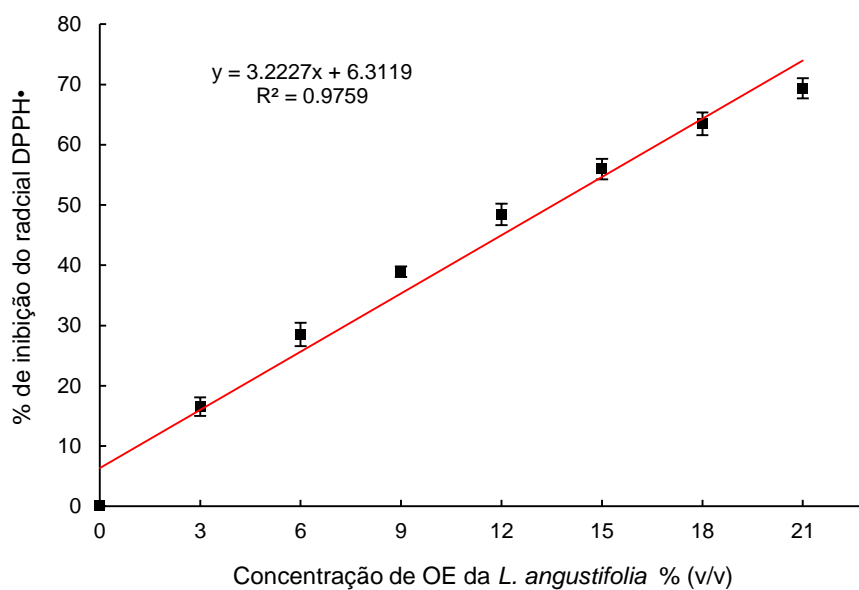


Figura 8. Porcentagem de inibição do radical DPPH• das soluções de óleo essencial da *L. angustifolia*.

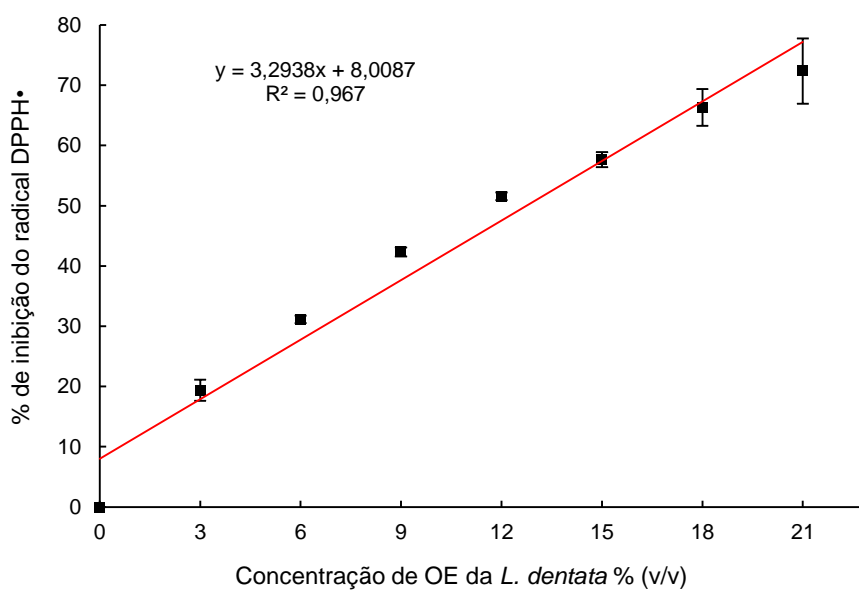


Figura 9. Porcentagem de inibição do radical DPPH• das soluções de óleo essencial da *L. dentata*.

A partir das equações das retas obtidas, foi calculado o valor de EC_{50} , correspondendo à quantidade de óleo essencial necessária para inibir 50% dos

radicais DPPH• presentes na solução; assim, quanto menor o EC₅₀, melhor é a capacidade antioxidante. Os valores encontrados de EC₅₀ foram de 13,5%, que corresponde a 123.660 µg/mL para a *L. angustifolia* e de 12,7%, que corresponde a 117.348 µg/mL para a *L. dentata*, mostrando que, quando comparados com o ácido gálico, os óleos precisam ser usados em concentrações maiores para apresentar metade da atividade antioxidante.

Um trabalho realizado por Silva *et al.* (2015) também avaliou o potencial antioxidante do óleo essencial da *L. angustifolia* utilizando radical DPPH•. A maior atividade inibitória foi observada nas concentrações mais altas testadas do óleo, e o EC₅₀ apresentado foi de 51,05 mg/mL, demonstrando atividade antioxidante, mas sendo esta habilidade dependente da concentração. Essa diferença pode ser justificada pela variação dos componentes majoritários dos dois óleos usados por Silva *et al.* (2015) e os deste trabalho.

Yang *et al.* (2010) relatou que seis óleos essenciais analisados em seu estudo, incluindo o da *L. angustifolia*, também inibiram a formação de radicais DPPH• de maneira dose-dependente. Além disso, avaliaram igualmente o potencial antioxidante de alguns dos principais compostos químicos encontrados nos óleos. A maior atividade antioxidante foi obtida pelo óleo essencial da lavanda, composto por 28,2% de acetato de linalila e 17,1% de linalol, e pelo componente limoneno, enquanto que 1,8-cineol e α-pineno apresentaram a menor capacidade de inibição do radical DPPH•. Corroborando com os resultados obtidos por Yang *et al.* (2010) os resultados deste trabalho apresentaram baixa atividade antioxidante usando a metodologia do radical DPPH•, uma vez que nos dois óleos deste estudo os componentes majoritários foram 1,8-cineol e cânfora. Dessa forma, justificaria uma

concentração elevada de óleo essencial para apresentar uma significativa atividade antioxidante.

Danh *et al.* (2013) comprovou uma grande variação no rendimento, na composição química, e na atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial da *L. angustifolia*, quando obtidos por diferentes métodos de extração. Este estudo corrobora com os resultados de Imelouane *et al.* (2010), que avaliou a atividade antioxidante do óleo essencial das flores e folhas da *L. dentata*, encontrando, respectivamente, valores de EC₅₀ de 4,13% e 3,21% (v/v), sugerindo que esta variação, em comparação com os resultados encontrados, demonstra que a composição de um óleo volátil, assim como sua capacidade antioxidante, pode variar de acordo com a genética e fatores ambientais, como a época de coleta, disponibilidade de água, nutrientes do solo, clima do local, entre outros (IMELOUANE *et al.*, 2010).

5.2.2. Atividade de inibição do radical ABTS•+

Outro ensaio utilizado para avaliar a atividade antioxidante é através da captura do radical ABTS•+, que pode ser gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 10), podendo medir a atividade de compostos hidrofílicos e lipofílicos, principalmente os fenólicos (RUFINO *et al.*, 2007; SCOTTI *et al.*, 2007).

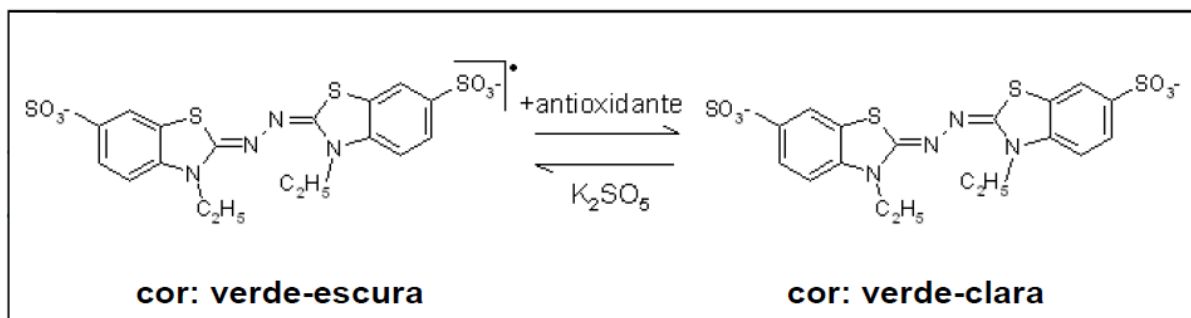


Figura 10. Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (RUFINO *et al.*, 2007).

Primeiramente, foi construída uma curva com uma substância antioxidante de referência, o trolox, mostrando a efetividade da metodologia em detectar esta propriedade das substâncias (Figura 11).

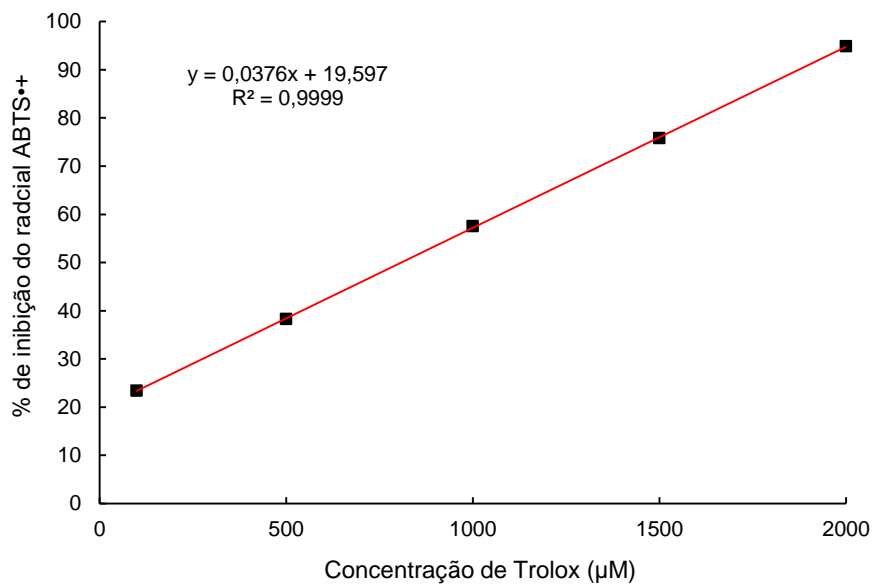


Figura 11. Curva padrão de trolox.

Em seguida, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações de cada óleo essencial de lavanda (0 a 27%), e obtida uma curva analítica de concentração

de óleo da *L. angustifolia* (Figura 12) e da *L. dentata* (Figura 13) frente à porcentagem de inibição do radical ABTS•+.

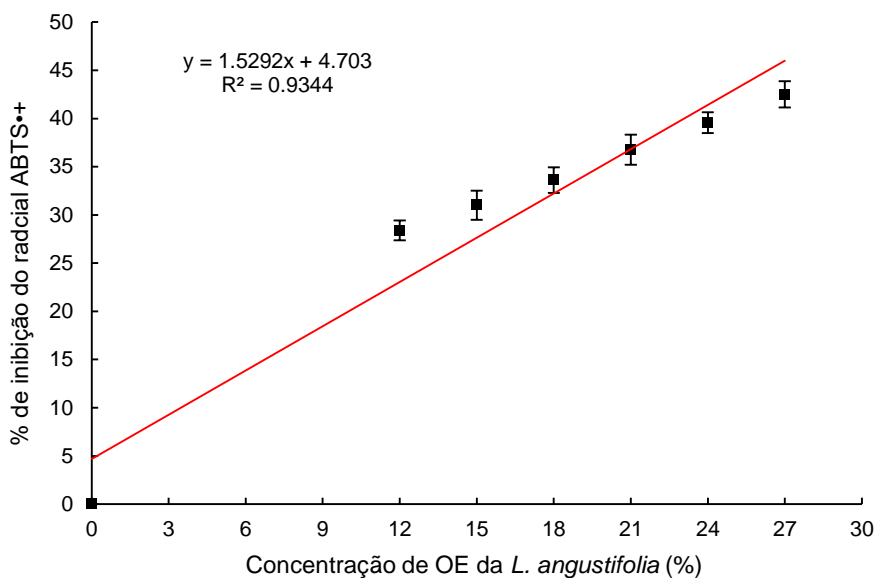


Figura 12. Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das soluções de óleo essencial da *L. angustifolia*.

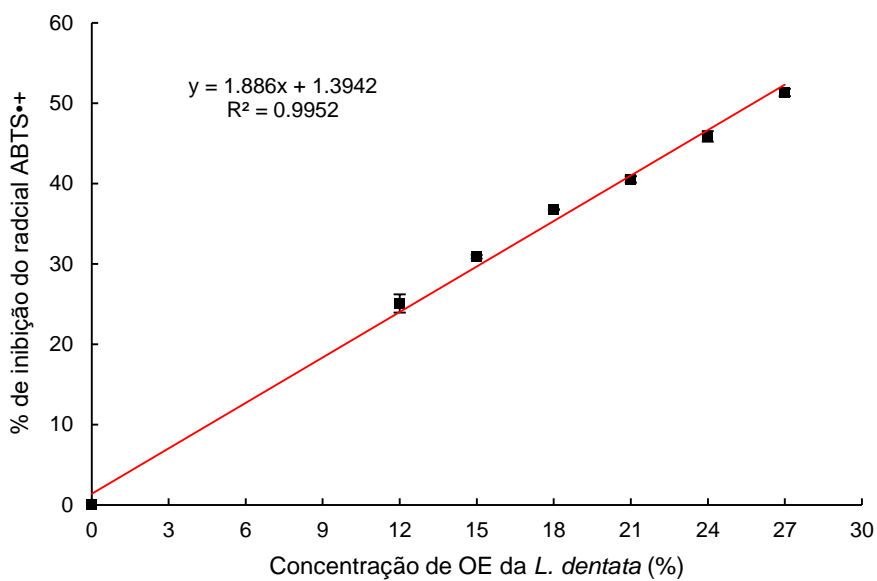


Figura 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das soluções de óleo essencial da *L. dentata*.

De acordo com as equações das retas obtidas, foi calculado o valor de EC_{50} , correspondendo à quantidade de óleo essencial necessária para inibir 50% dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ presentes na solução. Os valores encontrados de EC_{50} foram de 29,6% (271.136 $\mu\text{g/mL}$) para a *L. angustifolia* e de 25,8% (238.392 $\mu\text{g/mL}$) para a *L. dentata*.

Quando os valores de EC_{50} , de ambos os óleos essenciais, são comparados com os valores de EC_{50} obtidos pela metodologia de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$, os valores encontrados são maiores, significando que uma maior concentração de óleo é necessária para atingir a mesma capacidade antioxidante. Para a metodologia de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$, a concentração do óleo essencial da *L. angustifolia* e da *L. dentata* deve ser aproximadamente 2 vezes maior que a concentração dos mesmos óleos para a metodologia do radical $DPPH^{\bullet}$, sendo possível observar que os resultados entre as diferentes metodologias não são sempre iguais (OKONOGI *et al.*, 2007).

Segundo Yang *et al.* (2010), o óleo essencial de lavanda analisado em seu estudo, contendo linalol e acetato de linalila como majoritários, da mesma forma que o 1,8-cineol e α - e β -pineno analisados separadamente, também apresentaram baixa atividade antioxidante pela metodologia do radical $ABTS^{\bullet+}$, corroborando com os resultados deste trabalho.

O fato do radical $DPPH^{\bullet}$ e do radical $ABTS^{\bullet+}$ apresentarem diferenças estereoquímicas em sua estrutura (Figura 14), pode gerar influência no mecanismo de reação dos diferentes compostos antioxidantes presentes em espécies vegetais (MANTLE *et al.*, 1998; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; SCOTTI *et al.*, 2007).

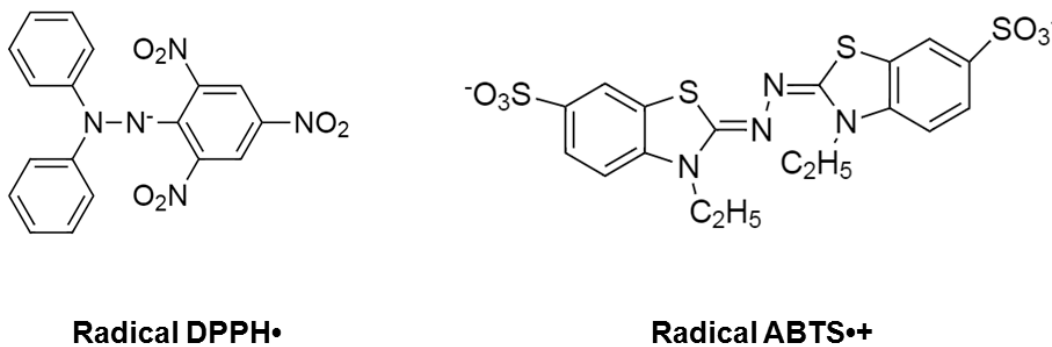


Figura 14. Estrutura química dos radicais DPPH• e ABTS•+ (Elaborado pela autora).

Através dos resultados obtidos por Almeida (2013), é possível concluir que o impedimento estérico dos componentes antioxidantes presentes nos óleos também influencia na reação pois, quanto maior o impedimento estérico de compostos antioxidantes, maior é a facilidade de reagir com o radical ABTS•+, uma vez que o elétron livre em sua estrutura não está na cavidade da estrutura como ocorre com o radical DPPH• (MANTLE *et al.*, 1998; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; SCOTTI *et al.*, 2007).

Portanto, os compostos 1,8-cineol e cânfora, encontrados nos óleos essenciais estudados nesse trabalho, provavelmente, possuem um menor impedimento estérico, não reagindo com o radical ABTS•+ e apresentando uma maior atividade antioxidante pela metodologia do radical DPPH•.

5.3. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pela metodologia que utiliza o corante vital MTT. Este corante, quando em contato com as células, sofre metabolização por suas mitocôndrias formando cristais insolúveis de violeta de formazana. Deste modo, é possível verificar a viabilidade celular (CHIARI *et al.*, 2012a; MOSMANN, 1983).

Os queratinócitos (HaCat) e os fibroblastos (HDFa) foram escolhidos por estarem presentes na epiderme e derme humana, respectivamente. Por se tratar de um estudo com ativo para uso cosmético, é importante conhecer quais os resultados do contato entre essas linhagens celulares e os óleos essenciais, já que os cosméticos são produtos de uso externo, aplicados topicamente sobre a pele (BRASIL, 2004; CORREA, 2012).

As células da linhagem HepG2 (células de hepatoma humano) foram utilizadas por serem metabolicamente competentes, sendo escolhidas em testes de citotoxicidade com o objetivo de prever a hepatotoxicidade de substâncias cosméticas ativas que, eventualmente, poderiam alcançar a corrente sanguínea (CHIARI *et al.*, 2012c).

Foram testadas diferentes concentrações de cada óleo essencial (0,156 a 5%) e construídos gráficos de porcentagem de células viáveis *versus* concentração de óleo essencial.

Os resultados obtidos, apenas para a linhagem HDFa, estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

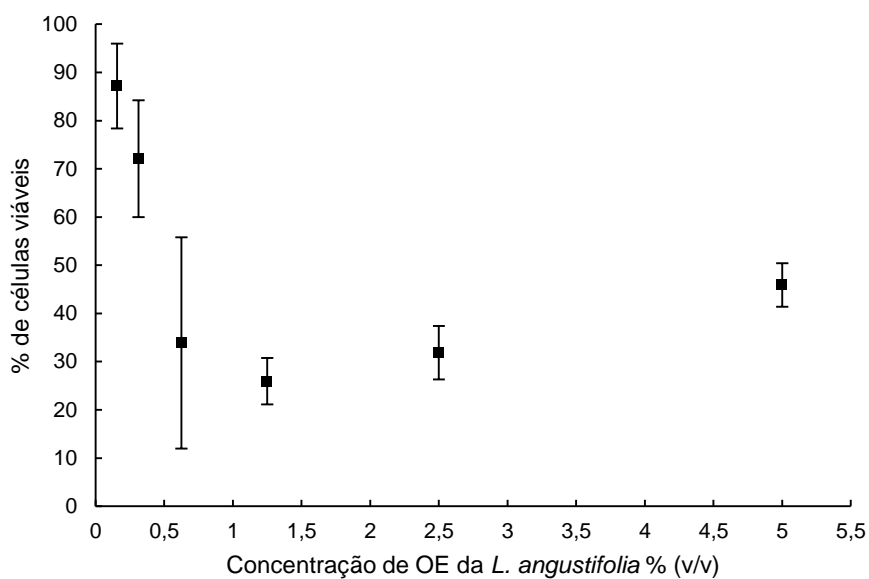


Figura 15. Curva de viabilidade celular para linhagem HDFa, após 24h de tratamento, com diferentes concentrações do óleo essencial da *Lavandula angustifolia* (Média dos valores de 3 experimentos independentes).

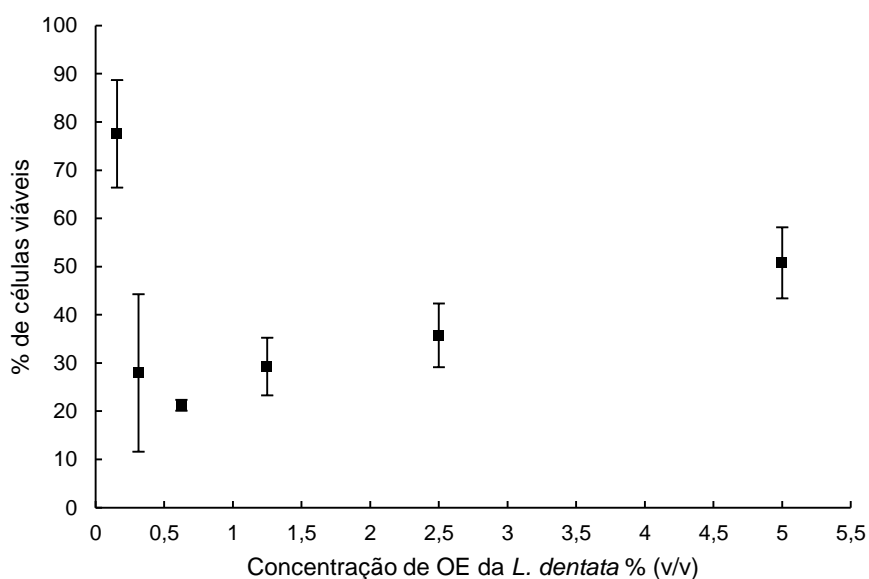


Figura 16. Curva de viabilidade celular para linhagem HDFa, após 24h de tratamento, com diferentes concentrações do óleo essencial da *Lavandula dentata* (Média dos valores de 3 experimentos independentes).

Com base na análise estatística dos resultados, foi possível observar não houve diferença significativa entre os grupos de tratamentos ($p > 0,05$). A viabilidade celular média de 70-100% foi observada na concentração de 0,156% (v/v) de óleo essencial das duas espécies de lavanda, diminuindo marcadamente quando a concentração aumentou para 0,625% (v/v). Deste modo, o aumento da viabilidade celular produzida na concentração máxima de 5%, provavelmente ocorreu devido ao desvio padrão elevado, observado entre as repetições do ensaio.

Foram obtidas também, para cada experimento independente, as equações das retas, geradas por regressão linear, fornecendo informações suficientes para que fosse calculada a concentração dos óleos essenciais necessária para provocar 50% de morte celular (EC_{50}).

Na Tabela 3 estão listados os valores de EC_{50} obtidos para cada óleo essencial testado.

Tabela 3. Valores percentuais de EC_{50} (v/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade em células HDFa, com os óleos essenciais de lavanda

Óleos essenciais	1	2	3	Média	Desvio padrão
<i>L. angustifolia</i>	0,811	0,424	0,411	0,548	0,227
<i>L. dentata</i>	0,376	0,307	0,290	0,324	0,045

Estes valores foram considerados baixos e podem ser inferidos comparando os resultados obtidos com outros trabalhos.

Um estudo realizado por Mantovani et al. (2013), que também analisaram o óleo essencial da *L. angustifolia* em fibroblastos humanos de outra linhagem (GM07492-A - Coriell Cell Repositories), foi verificada uma citotoxicidade

significativa, mas que, em relação às concentrações para as quais o óleo apresentou atividade larvicida *in vitro*, não foi considerado citotóxico.

Imelouane *et al.* (2010) avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial das flores e folhas da *Lavandula dentata* em cinco linhagens de células cancerígenas (MCF-7, PC3, U-373, V79 e P388D1), a fim de saber se o óleo teria mesmo a capacidade de induzir morte celular nestes tipos de células. O EC₅₀ apresentado também foi considerado baixo, e pode estar relacionado a componentes específicos do óleo, seja o componente majoritário ou aqueles encontrados em menores quantidades, que também podem contribuir para a citotoxicidade, existindo sinergismo entre eles.

Em outro estudo, Prashar *et al.* (2004) utilizaram o corante Vermelho Neutro para avaliar a viabilidade celular do óleo essencial da *Lavandula angustifolia*. Este corante possui a capacidade de penetrar nas membranas das células viáveis e de se ligar aos seus lisossomos (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Apesar de o mecanismo ser diferente do corante MTT, os autores demonstraram a citotoxicidade do óleo a uma concentração de 0,25%, em três tipos de células testadas (HMEC-1, HNDF e 153BR). O EC₅₀ foi calculado entre aproximadamente 0,17 e 0,19%, e os componentes majoritários do óleo, acetato de linalila e linalol, também foram testados em condições similares para a sua citotoxicidade. Foi observado que o acetato de linalila apresentou maior citotoxicidade em relação à do próprio óleo, podendo sugerir supressão de sua atividade por um fator desconhecido (PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2004).

Para as linhagens celulares HaCat e HepG2 não foi possível calcular os valores de EC₅₀, devido a não formação dos cristais insolúveis de violeta de formazana em relação ao controle negativo e ao solvente, provavelmente, pela

ocorrência de morte celular em todas as concentrações testadas, conforme pode ser observado na Figura 17, podendo sugerir a citotoxicidade dos óleos essenciais.

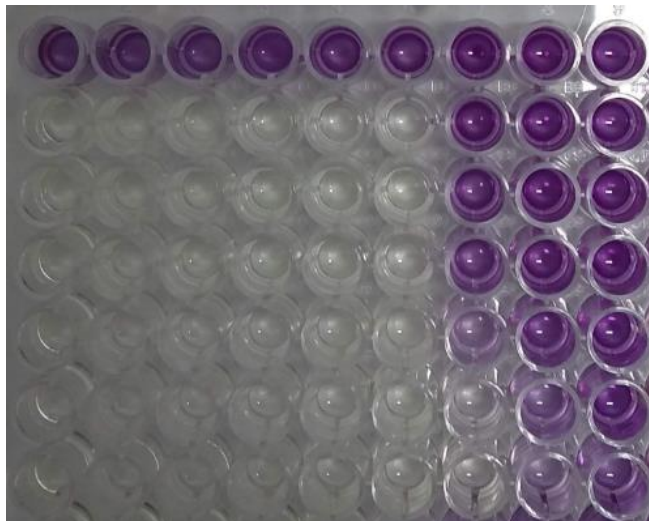


Figura 17. Imagem da microplaca com a não formação dos cristais de formazana dos óleos essenciais em relação ao controle negativo e ao solvente (Elaborada pela autora).

Também foi possível observar, para os queratinócitos (HaCat), a formação de turvação em alguns poços das microplacas, conforme mostrado na Figura 18, possivelmente, pela remoção das células aderidas durante o experimento, causando interferência na leitura das absorbâncias.

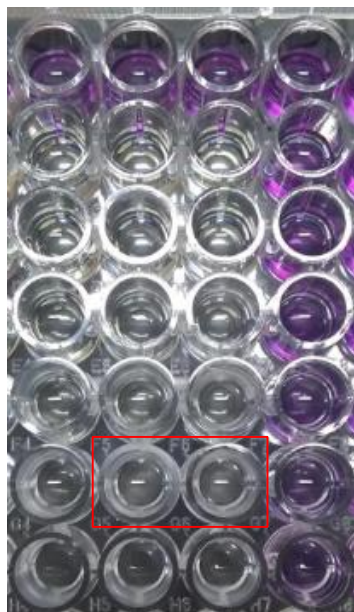


Figura 18. Imagem da microplaca com a turvação formada em alguns poços do ensaio com a linhagem HaCat (Elaborada pela autora).

Segundo Burt *et al.* (2005) e Imelouane *et al.* (2010), terpenos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos, são responsáveis pela natureza hidrofóbica dos óleos essenciais. Esta hidrofobicidade permite que estes compostos atravessem livremente ou interajam com a membrana celular, podendo causar mudanças fisiológicas e resultar na perda da permeabilidade e consequente morte celular. No entanto, considerando o grande número de constituintes, além das interações sinérgicas e antagônicas entre eles, também é possível que os óleos essenciais tenham outros alvos celulares, como os lipídios e as proteínas (BAKKALI *et al.*, 2008).

As diversas atividades terapêuticas descritas na literatura sobre os óleos essenciais de lavanda, juntamente com as suas propriedades aromáticas, tornaram comum a sua utilização em baixas concentrações, em várias indústrias. Porém, se o uso desses óleos for estendido a outras aplicações, que possam exigir concentrações mais altas, o aumento da exposição dos seres humanos a eles é uma

questão a ser abordada e, portanto, assuntos como segurança e toxicidade precisarão sempre ser analisados (PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2004).

Entretanto, a avaliação da citotoxicidade apresenta limitações. A utilização de culturas de células em monocamada, bidimensional, não é fisiológica, pois não reproduz a arquitetura tecidual *in vivo*, tridimensional. O que é observado *in vitro* é uma parte simplificada dos mecanismos complexos *in vivo*, sendo que as células raramente agem separadas, quando as camadas subjacentes podem ajudar na realização do reparo da agressão superficial. Portanto, a presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que a substância seja tóxica quando aplicada *in vivo* (DEMARCO *et al.*, 1998; PIZZOFERRATO *et al.*, 1994), sendo necessário mais de um ensaio para determinar a viabilidade celular em estudos *in vitro*, e aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

5.4. Avaliação da produção de colágeno

Os fibroblastos são uma linhagem celular presente na derme humana, capaz de produzir diferentes proteínas da matriz extracelular, como é o caso do colágeno. A síntese desta proteína é essencial para a cicatrização, além de oferecer sustentação e elasticidade à pele (AMADEU *et al.*, 2003; JORGE *et al.*, 2008).

Desta forma, os fibroblastos da linhagem HDFa foram escolhidos para este ensaio, com a finalidade de avaliar o efeito do tratamento com os óleos essenciais de lavanda na indução da produção de colágeno, como um possível estimulante da cicatrização.

A curva analítica, utilizada para a determinação das concentrações de colágeno tipo I produzidas pelos fibroblastos, está apresentada na Figura 19.

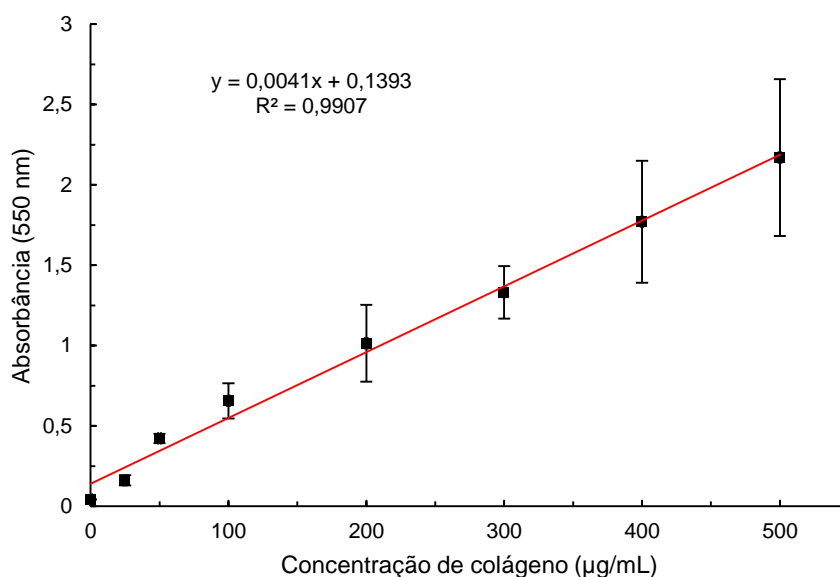


Figura 19. Curva analítica da concentração de colágeno (µg/mL) *versus* a absorbância (550 nm).

O tratamento foi realizado com os óleos essenciais da *L. angustifolia* e da *L. dentata*, solubilizados em etanol. Por este motivo, o perfil de produção de colágeno por estes fibroblastos também foi avaliado com diferentes concentrações do solvente.

Foram construídos dois tipos de gráficos para cada tratamento, sendo um de porcentagem relativa de produção de colágeno *versus* concentração de óleo essencial ou solvente, mostrados nas Figuras 20, 22 e 24, e outro de concentração de colágeno *versus* concentração de óleo essencial ou solvente, mostrados nas Figuras 21, 23 e 25.

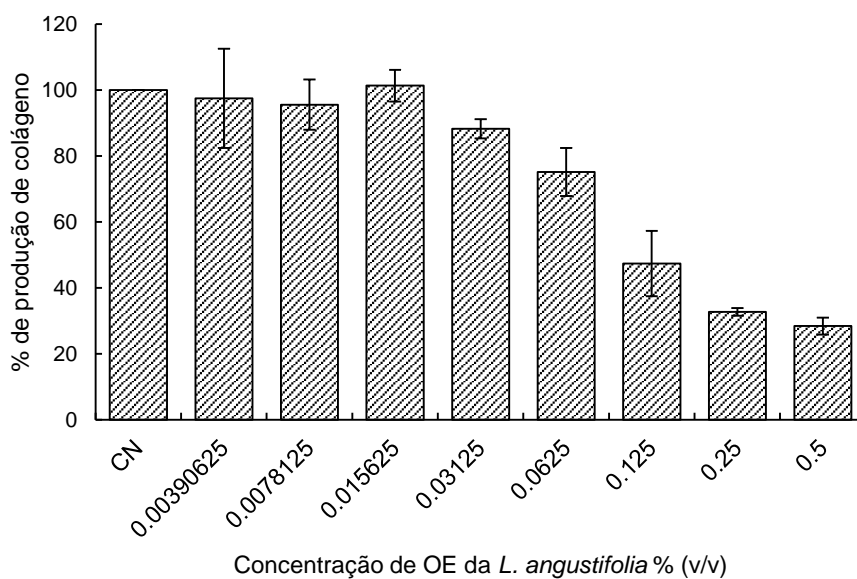


Figura 20. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da *L. angustifolia*.

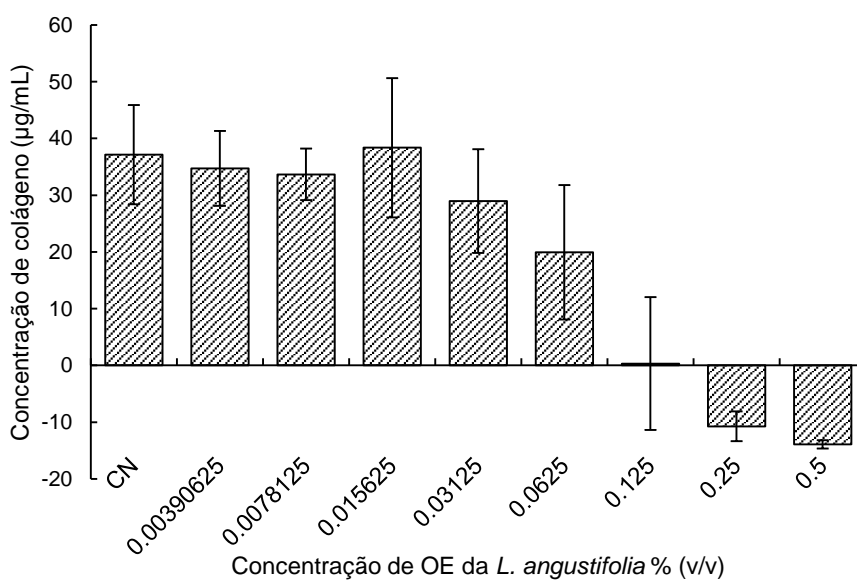


Figura 21. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da *L. angustifolia*.

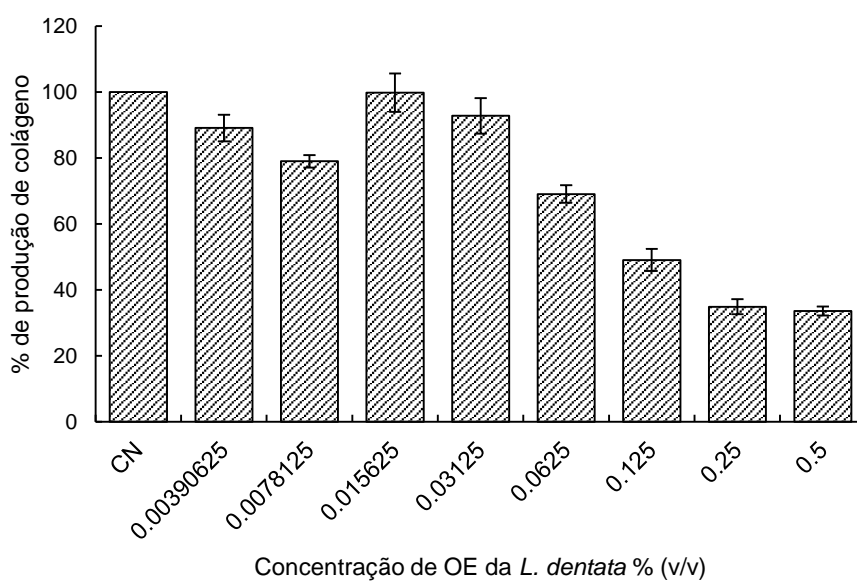


Figura 22. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da *L. dentata*.

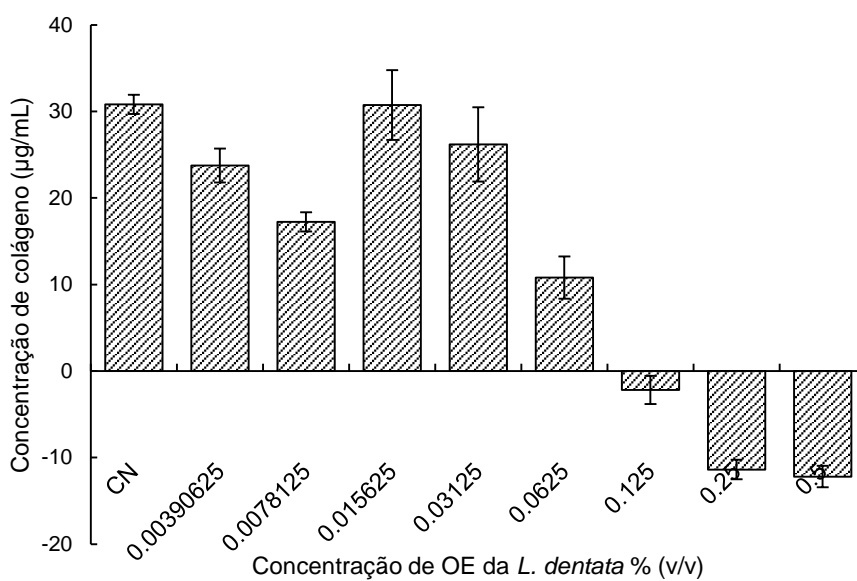


Figura 23. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o óleo essencial da *L. dentata*.

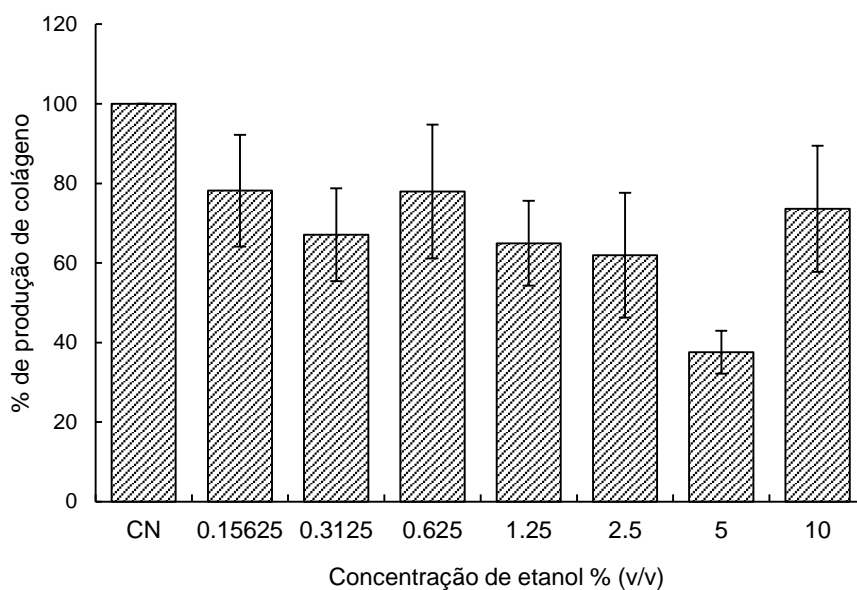


Figura 24. Porcentagem de produção relativa de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o etanol.

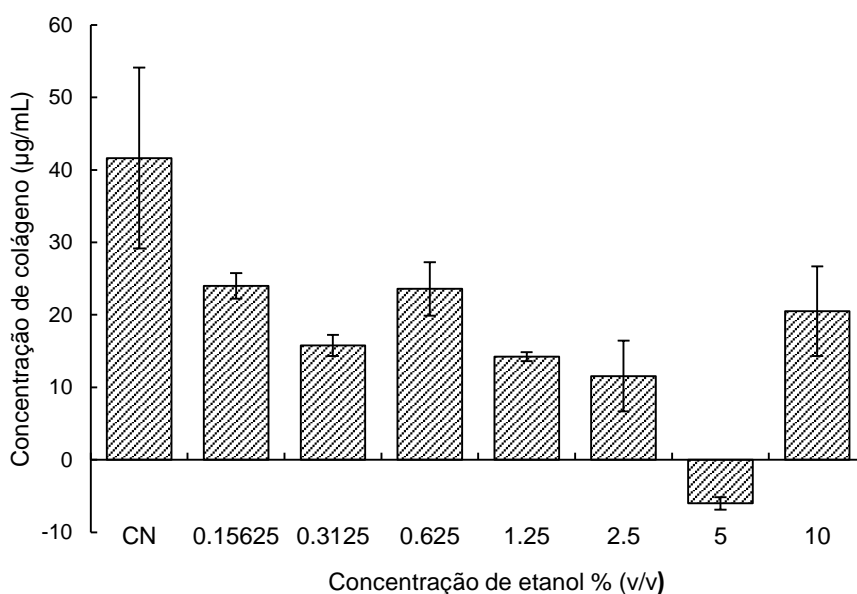


Figura 25. Concentração de colágeno em células HDFa, após 24h de tratamento, com o etanol.

Com base na análise estatística dos resultados, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos de tratamentos ($p > 0,05$), sendo

constatado que, ao utilizar concentrações inferiores e não citotóxicas, os óleos essenciais não promoveram estímulos na síntese de colágeno em relação ao controle negativo e que, ao utilizar concentrações superiores, ocorreu morte celular. Porém, não foi possível afirmar se a produção de colágeno não ocorreu por causa da baixa concentração utilizada, ou se os óleos, de fato, não causam efeito promotor na síntese dessa proteína, sendo necessários estudos complementares.

Foi possível observar, também, que o etanol não interferiu na produção de colágeno, mas causou morte celular. Deste modo, a redução na síntese de colágeno que ocorreu nas concentrações superiores de óleos essenciais, não foi devida somente a citotoxicidade deles, mas, também, à citotoxicidade do solvente.

Lusby *et al.* (2006), investigou a ação do mel e do óleo essencial de *Lavandula x allardii*, usando um modelo de ferida em ratos. A cicatrização foi analisada pela contração da ferida e volume capilar de 5 e 12 dias pós-cirurgia. Estatisticamente, não foi observada diferença na contração da ferida tratada com o mel ou com o óleo essencial em relação ao controle não tratado, mas uma redução do volume capilar no local da ferida pode ser observada no dia 12. No entanto, os autores sugerem que mais pesquisas são necessárias para investigar esses efeitos em outros aspectos da cicatrização, como a citocina e produção ou remodelação tecidual a nível celular.

Outro estudo também utilizou o modelo de ferida em ratos para a avaliação da atividade de cicatrização do extrato hidroetanólico da *Lavandula officinalis*. De acordo com os resultados, 5% de extrato diminuiu significativamente a taxa de contração da ferida, enquanto que a formação de novos vasos e a infiltração de fibroblastos no local da ferida aumentou em comparação com o grupo controle. Estes resultados sugerem que o extrato hidroetanólico tem efeito benéfico na

cicatrização de feridas em ratos, e pode ser útil no tratamento de vários tipos de feridas (FARAHPOUR *et al.*, 2015).

Uma pesquisa realizada por Vakilian *et al.* (2011) avaliou o efeito do óleo essencial de lavanda na cicatrização de feridas na episiotomia (incisão efetuada na região do períneo). O grupo de tratamento recebeu óleo de lavanda e os controles receberam iodo-povidona, e os locais de incisão foram avaliados no 10º dia pós-parto. Vinte cinco de 60 mulheres do grupo de tratamento e 17 mães do grupo controle não tiveram dor. Também não houve diferença significativa entre os dois grupos nas complicações do local da cirurgia. No entanto, a vermelhidão no grupo de tratamento foi significativamente menor do que os controles, sugerindo a aplicação de OE em vez de iodo-povidona para o tratamento de feridas na episiotomia.

Cardia *et al.* (2018) avaliou o efeito do óleo essencial da *Lavandula angustifolia* na resposta inflamatória aguda. A aplicação tópica do OE reduziu a formação do edema, da atividade de mieloperoxidase e da produção de óxido nítrico nos modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton, no de edema de pata induzido por carragenina e no de edema de pata induzido por dextrana, concluindo que o OE apresentou atividade anti-inflamatória, e que o mecanismo proposto pelos autores parece envolver a participação de prostanóides, óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e histamina.

Portanto, é possível perceber, através da literatura, que muitos estudos realizados com diferentes espécies de lavanda demonstram sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante; porém, poucos elucidam o real mecanismo de ação dos seus óleos ou extratos e quais substâncias químicas estão exatamente relacionadas a essas propriedades terapêuticas. Deste modo, o ensaio de produção de colágeno

realizado neste trabalho foi uma tentativa de esclarecer uma possível indução dos óleos essenciais na síntese dessa proteína, etapa importante da cicatrização.

5.5. Determinação das nanoemulsões

5.5.1. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)

Misturas, como um par de tensoativos não iônicos hidrofílicos e lipofílicos, para obter gotículas de diâmetro pequeno, são comumente utilizadas. Sorbitan Oleate e Polysorbate 20 têm sido usados em métodos de baixa energia, sendo capazes de produzir nanoemulsões com menor tamanho médio de gotículas. Isso pode ser explicado pela desigualdade no comprimento da cadeia CH entre Span[®] e Tween[®], ou pela presença de uma ligação dupla na cadeia, favorecendo a formação de nanoemulsões com tamanhos menores de gotículas (FERNANDES *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2009). Também de acordo com a literatura, a proporção com 90% de água destilada, 5% de óleo essencial e 5% da mistura de tensoativos é suficiente para obter nanoemulsões em uma faixa que possibilita a determinação de valores de EHL, empregando um único par de tensoativos (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002).

O valor de EHL requerido de cada porcentagem dos tensoativos não iônicos, misturados em diferentes proporções, foi descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de EHL e composição percentual da mistura de tensoativos, óleo essencial e água destilada

EHL	<i>Lavandula</i> spp. %^a	Sorbitan Oleate %	Polysorbate 20 %	Aqua %
8	5,00	3,51	1,49	90,00
9	5,00	3,10	1,90	90,00
10	5,00	2,70	2,30	90,00
11	5,00	2,30	2,70	90,00
12	5,00	1,90	3,10	90,00
13	5,00	1,49	3,51	90,00
14	5,00	1,09	3,91	90,00
15	5,00	0,68	4,32	90,00
16	5,00	0,28	4,72	90,00
16,7	5,00	0,00	5,00	90,00

^a Óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata*.

Essa estratégia, além de permitir a determinação do valor de EHL requerido (EHLr) dos óleos essenciais, definido como o EHL do tensoativo ou mistura de tensoativos capaz de formar a nanoemulsão mais estável, também é usada para otimizar as nanoemulsões (FERNANDES *et al.*, 2013).

Os valores obtidos de EHLr para os óleos essenciais da *Lavandula angustifolia* (Figura 26) e da *Lavandula dentata* (Figura 27), foram, respectivamente, EHL 12 e EHL 9, pois, macroscopicamente, as formulações referentes a esses valores de EHL não apresentaram cremeação e/ou separação de fase após 24 horas, permanecendo translúcidas a olho nu e apresentando um reflexo azulado característico de nanoemulsões, associado ao efeito de Tyndall (SOLANS; SOLÉ, 2012). As demais formulações apresentaram fatores de instabilidade (cremeação e separação de fase), após 24 horas, e por isso não foram consideradas estáveis.

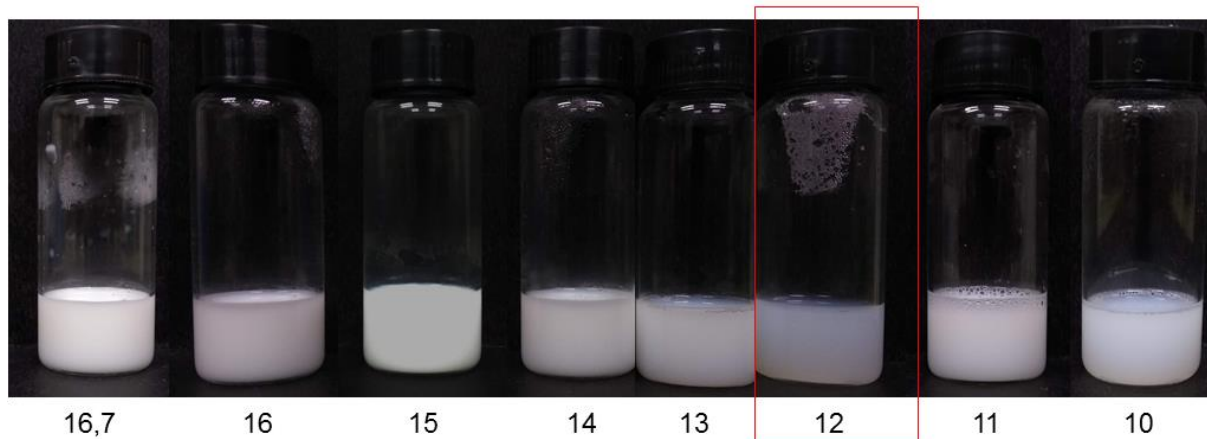


Figura 26. Formulações obtidas referentes aos valores de EHL para o óleo essencial da *Lavandula angustifolia*.

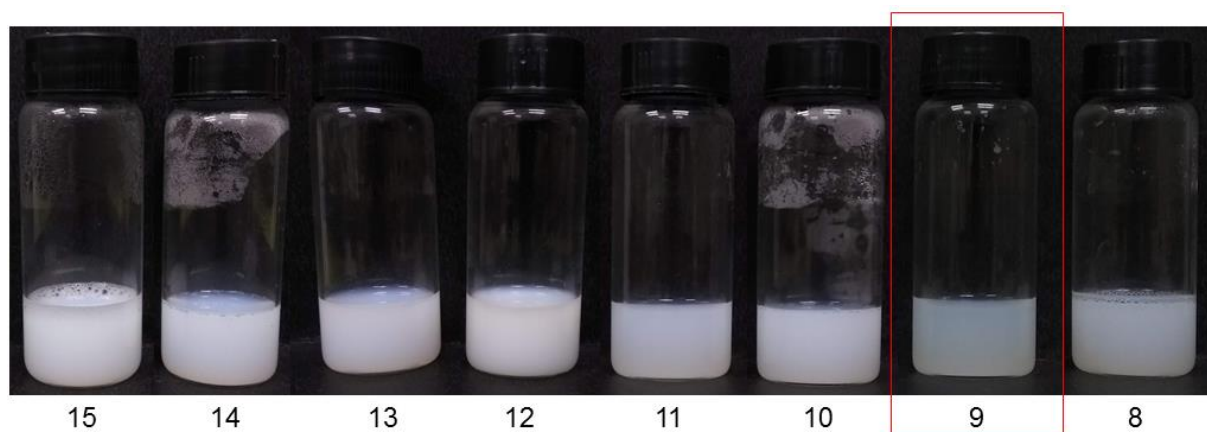


Figura 27. Formulações obtidas referentes aos valores de EHL para o óleo essencial da *Lavandula dentata*.

Foi possível observar também, que os valores de EHL determinados foram diferentes para cada uma das espécies do mesmo gênero *Lavandula*, provavelmente relacionados à sua composição química baseada em mono e sesquiterpenos. A determinação de EHL é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de cosméticos e pode ser empregada com sucesso na formulação de produtos com ativos de origem natural, como aqueles baseados em óleos

essenciais, além de poder ser usada como parâmetro de qualidade (FERNANDES *et al.*, 2013).

5.5.2. Determinação da porcentagem dos componentes para obtenção do mesmo EHL

Com o objetivo de se obter formulações mais estáveis, em relação as formulações obtidas no item 5.5.1, foram usadas composições anteriormente descritas na literatura e que são comumente utilizadas na obtenção de nanoemulsões (FERNANDES *et al.*, 2014). Foram preparadas 10 formulações usando diferentes porcentagens de óleo essencial, da mistura de tensoativos e de água destilada (Tabela 5). A composição da mistura de tensoativos foi mantida constante e, a quantidade de cada um, correspondeu à proporção que resultou no valor de EHL necessário da fase oleosa: Sorbitan Oleate/Polysorbate 20 com EHL 12 para *L. angustifolia* e Sorbitan Oleate/Polysorbate 20 com EHL 9 para *L. dentata*.

Tabela 5. Composição percentual das formulações

Formulação	Óleo essencial %	Mistura de tensoativos %	Água destilada %
1	2,5	7,5	90,0
2	5,0	5,0	90,0
3	5,0	7,5	87,5
4	5,0	10,0	85,0
5	5,0	12,5	82,5
6	5,0	2,5	92,5
7	7,5	2,5	90,0
8	7,5	5,0	87,5
9	7,5	7,5	85,0
10	7,5	10,0	82,5

Conforme pode ser observado nas Figuras 28 e 29, as combinações dos componentes desenvolveram formulações nas proporções determinadas. No entanto, é preciso analisar a distribuição do tamanho de gotícula para afirmar que são nanoemulsões.

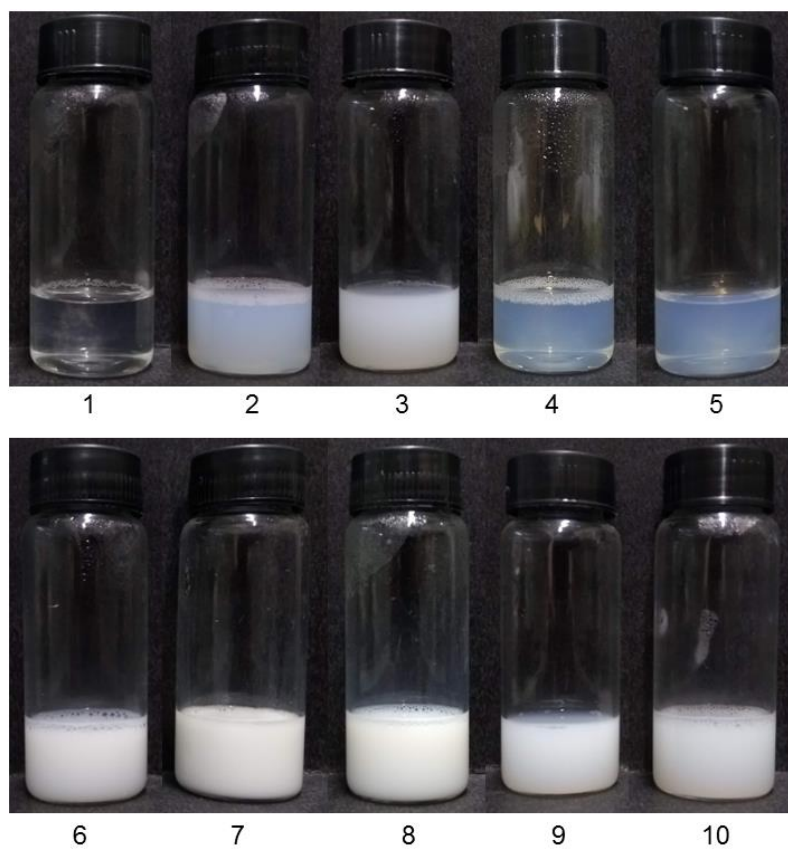


Figura 28. Formulações obtidas com diferentes porcentagens de água destilada, tensoativos e óleo essencial da *L. angustifolia*.

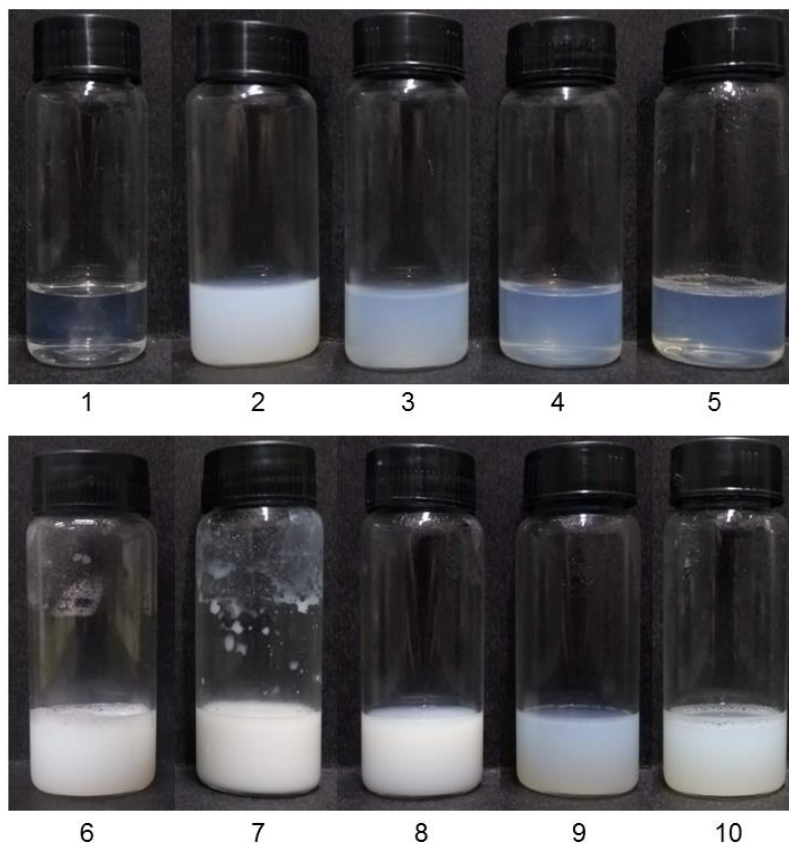


Figura 29. Formulações obtidas com diferentes porcentagens de água destilada, tensoativos e óleo essencial da *L. dentata*.

Portanto, as formulações 2, 3, 4 e 5 de cada óleo essencial foram escolhidas para a análise do tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta, pois, macroscopicamente, não apresentaram cremeação, separação de fase e/ou presença de sedimento em relação às demais formulações, permanecendo com aspecto translúcido e reflexo azulado após 24 horas. Os valores estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, e os gráficos com as médias de tamanho e distribuição de gotículas das formulações com o óleo essencial da *L. angustifolia* e da *L. dentata* se encontram, respectivamente, nos Apêndices 5 e 6.

Tabela 6. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de cada formulação preparada com o óleo essencial da *L. angustifolia*

Formulação	Tamanho de gotícula (nm) ^a	Pdl ^b	Potencial Zeta (mV) ^c
2	40,9 ± 0,0	0,258 ± 0,004	-21,0 ± 4,5
3	47,2 ± 0,7	0,522 ± 0,018	-17,6 ± 1,4
4	15,4 ± 0,2	0,260 ± 0,023	-13,5 ± 2,8
5	14,0 ± 0,1	0,280 ± 0,007	-12,5 ± 1,9

^{a,b,c} Letras diferentes indicam parâmetros com valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Tabela 7. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de cada formulação preparada com o óleo essencial da *L. dentata*

Formulação	Tamanho de gotícula (nm) ^a	Pdl ^b	Potencial Zeta (mV) ^c
2	31,3 ± 1,4	0,761 ± 0,059	-15,3 ± 1,6
3	21,1 ± 0,2	0,627 ± 0,013	-12,4 ± 1,0
4	13,6 ± 0,6	0,291 ± 0,127	-7,9 ± 1,8
5	12,0 ± 0,1	0,282 ± 0,004	-12,4 ± 2,8

^{a,b,c} Letras diferentes indicam parâmetros com valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Nanoemulsões são emulsões ultrafinas, transparentes ou translúcidas a olho nu, apresentando um reflexo azulado, com tamanho médio de gotícula extremamente pequeno (entre 20 e 500 nm) (FORGIARINI *et al.*, 2000; SOLANS; SOLÉ, 2012). Segundo LEFEVRE e colaboradores, 2016, um sistema nanoemulsionado é mais estável quanto maior homogeneidade apresentar na distribuição do tamanho de suas gotículas.

Essa homogeneidade é refletida no índice de polidispersão, onde os valores são expressos em uma escala de 0,0 a 1,0. Deste modo, valores inferiores a 0,2 são indicativos de distribuição homogênea, em relação ao tamanho de gotícula, e maior estabilidade contra a coalescência ou o fenômeno de *Ostwald ripening* (KLANG *et al.*, 2012; TANG; JI; WANG, 2011), considerado o principal mecanismo para a instabilização de uma nanoemulsão, devido à agregação de pequenas gotículas em gotículas maiores (SOLANS; SOLÉ, 2012). A coalescência ocorre devido à baixa tensão interfacial entre as fases, enquanto o fenômeno de *Ostwald ripening* ocorre devido à elevada solubilidade do óleo em água (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Outro parâmetro a ser analisado é o potencial Zeta, que também desempenha um papel importante na determinação da estabilidade de nanoemulsões, pois reflete a força de repulsão entre as gotículas de mesma carga (BRUXEL *et al.*, 2012).

A estabilidade máxima de uma formulação é observada quando o valor de potencial Zeta é superior a 30 mV em módulo, pois assegura uma barreira de repulsão contra os fatores de instabilidade (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Neste trabalho, as nanoemulsões apresentaram potencial Zeta entre -21,0mV e -12,5mV para a *L. angustifolia* e -15,3mV e -7,9mV para a *L. dentata*, mostrando que, embora não tenham apresentado potencial Zeta como indicado por Araújo *et al.* (2011) as nanoemulsões 2 e 4, respectivamente *L. angustifolia* e *L. dentata*, foram escolhidas, em função dos outros parâmetros apresentados, indicativos de estabilidade para a continuidade dos ensaios.

Além disso, a baixa porcentagem de tensoativo pode ser considerada uma vantagem, uma vez que reduziria a toxicidade e os custos com as matérias-primas, quando comparada a outras nanoemulsões com concentrações mais elevadas de tensoativos (FERNANDES *et al.*, 2014). Neste trabalho, as formulações 2 de *L.*

angustifolia e 4 de *L. dentata* evidenciam vantagem para que fossem escolhidas, pois são constituídas por menor quantidade de tensoativos, quando relacionadas à formulação 5 de ambos os óleos, que também apresentou melhor Pdl.

Portanto, a formulação 2, a escolhida para a *L. angustifolia*, é composta por 5% de óleo essencial, 5% da mistura de tensoativos e 90% de água destilada, apresentando pequeno tamanho médio de gotícula ($40,86 \pm 0,01$ nm), baixo índice de polidispersão ($0,258 \pm 0,004$) e potencial Zeta mais próximo do valor indicativo de estabilidade máxima ($-21,0 \pm 4,5$).

Para a *L. dentata*, a formulação escolhida foi a 4, composta por 5% de óleo essencial, 10% da mistura de tensoativos e 85% de água destilada, também apresentando pequeno tamanho médio de gotícula ($13,61 \pm 0,57$ nm) e baixo índice de polidispersão ($0,291 \pm 0,127$). Apesar do potencial Zeta não apresentar o valor mais próximo ou dentro do valor indicativo de estabilidade máxima ($-7,9 \pm 1,8$), foi considerada também a concentração de tensoativos usada, quando comparada com a formulação 5, que igualmente apresentou comportamento estável, pequeno tamanho de gotículas e baixo índice de polidispersão, mas utilizou uma maior concentração de tensoativos.

5.5.3. Determinação dos tensoativos

Uma vez que o EHL e a melhor proporção foram determinados para cada óleo essencial, o tamanho de gotícula, o índice de polidispersão e o potencial Zeta foram estudados usando diferentes misturas de tensoativos, a fim de otimizar a estabilidade das nanoemulsões.

Os pares de tensoativos utilizados foram Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20 e Sorbitan Oleate/Polysorbate 80, bem como Resassol® Apostrophie, um tensoativo de

origem natural, baseado em matérias-primas sustentáveis e desenvolvido para formulações a frio (RES PHARMA, 2018). As proporções dos componentes foram mantidas conforme determinadas anteriormente para cada óleo, com a mistura de tensoativos correspondendo à proporção que resultou no valor de EHL necessário da fase óleos, respectivamente EHL 12 para *L. angustifolia* e EHL 9 para *L. dentata*.

Conforme pode ser observado na Figura 30, o tensoativo Resassol® Apostrophie não desenvolveu, na proporção determinada, uma formulação estável para o óleo essencial da *L. angustifolia*, apresentando, antes de 24 horas, separação de fase. Com esse dado e, a fim de se obter informações rápidas quanto a possíveis processos de instabilidade, o teste de centrifugação foi realizado (RIBEIRO *et al.*, 2015), após 24 horas, somente com as formulações A e B, da Figura 30, com os pares de tensoativos Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20 e Sorbitan Oleate/Polysorbate 80. Embora a formulação com os pares de tensoativos Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20 tenha apresentado cremeação, as duas formulações, A e B, foram analisadas em relação ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta para a *L. angustifolia*.

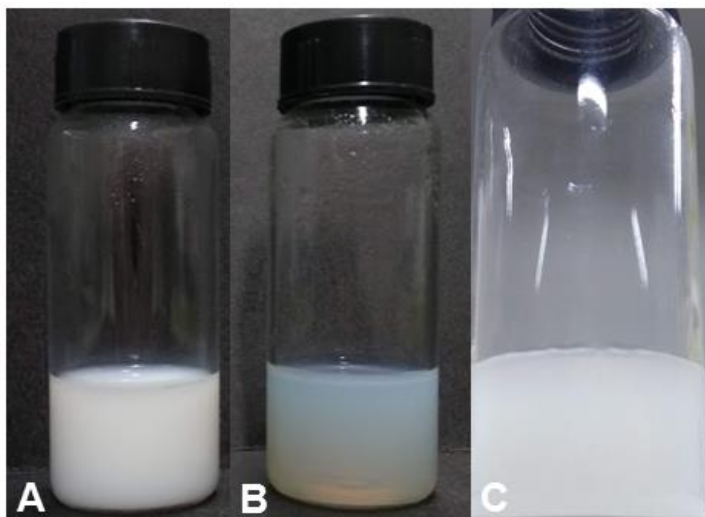


Figura 30. Nanoemulsões preparadas com OE da *L. angustifolia* e diferentes pares de tensoativos: (A) Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20, (B) Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e (C) Resassol® Apostrophie.

A Figura 31 mostra as nanoemulsões preparadas com OE da *L. dentata* e diferentes pares de tensoativos: (A) Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20, (B) Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e (C) Resassol® Apostrophie. Conforme pode ser observado, as três formulações não apresentaram, macroscopicamente e através da centrifugação, fatores de instabilidade, como cremeação ou separação de fases, após 24 horas, e, portanto, foram analisadas em relação ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta.

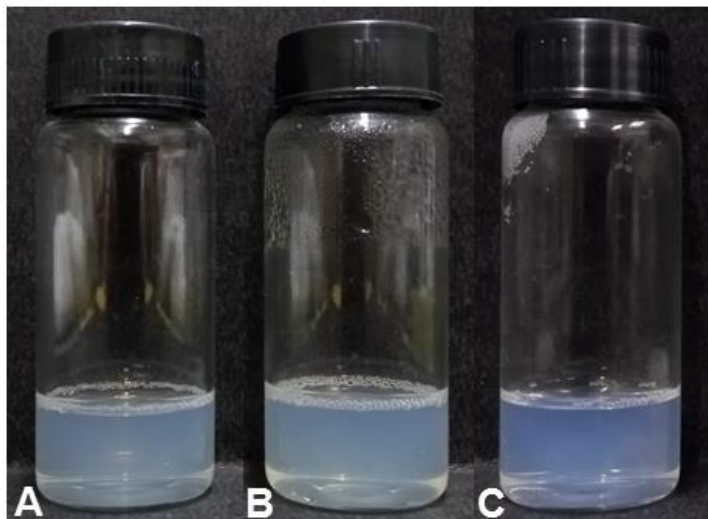


Figura 31. Nanoemulsões preparadas com OE da *L. dentata* e diferentes pares de tensoativos: (A) Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20, (B) Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e (C) Resassol® Apostrophe.

Os valores das análises estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, e os gráficos com as médias de tamanho e distribuição de gotículas das formulações com o óleo essencial da *L. angustifolia* e da *L. dentata* se encontram, respectivamente, nos Apêndices 7 e 8.

Tabela 8. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de nanoemulsões preparadas com o óleo essencial da *L. angustifolia* e diferentes pares de tensoativos (EHL 12) na proporção 90:5:5

Formulação	Tamanho de gotícula (nm) ^a	Pdl ^b	Potencial Zeta (mV)
Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20	203,0 ± 3,0	0,271 ± 0,009	-25,8 ± 0,4
Sorbitan Oleate/Polysorbate 80	40,4 ± 0,2	0,166 ± 0,008	-24,5 ± 2,8
Resassol® Apostrophe	-	-	-

^{a,b} Letras diferentes indicam parâmetros com valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Tabela 9. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta de nanoemulsões preparadas com o óleo essencial da *L. dentata* e diferentes pares de tensoativos (EHL 9) na proporção 85:10:5

Formulação	Tamanho de gotícula (nm) ^a	Pdl	Potencial Zeta (mV) ^b
Sorbitan Oleate/PPG-5-Ceteth-20	14,7 ± 0,2	0,307 ± 0,017	-8,4 ± 0,3
Sorbitan Oleate/Polysorbate 80	13,2 ± 0,1	0,295 ± 0,008	-11,5 ± 1,4
Resassol® Apostrophe	162,7 ± 3,0	0,356 ± 0,047	-21,7 ± 0,7

^{a,b} Letras diferentes indicam parâmetros com valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

As Figuras 32 e 33 mostram as médias de tamanho e distribuição de gotículas das formulações escolhidas para a avaliação da estabilidade física, contendo, respectivamente, o óleo essencial da *L. angustifolia* e da *L. dentata*.

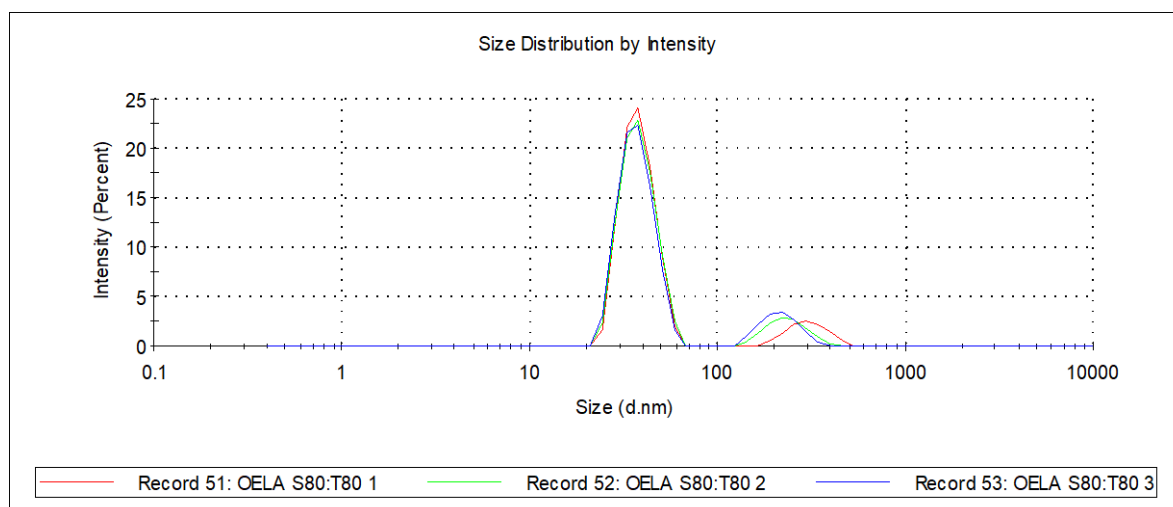


Figura 32. Distribuição do tamanho de gotícula da formulação preparada com os tensoativos Sorbitan Oleate/Polysorbate 80 e óleo essencial da *L. angustifolia*.

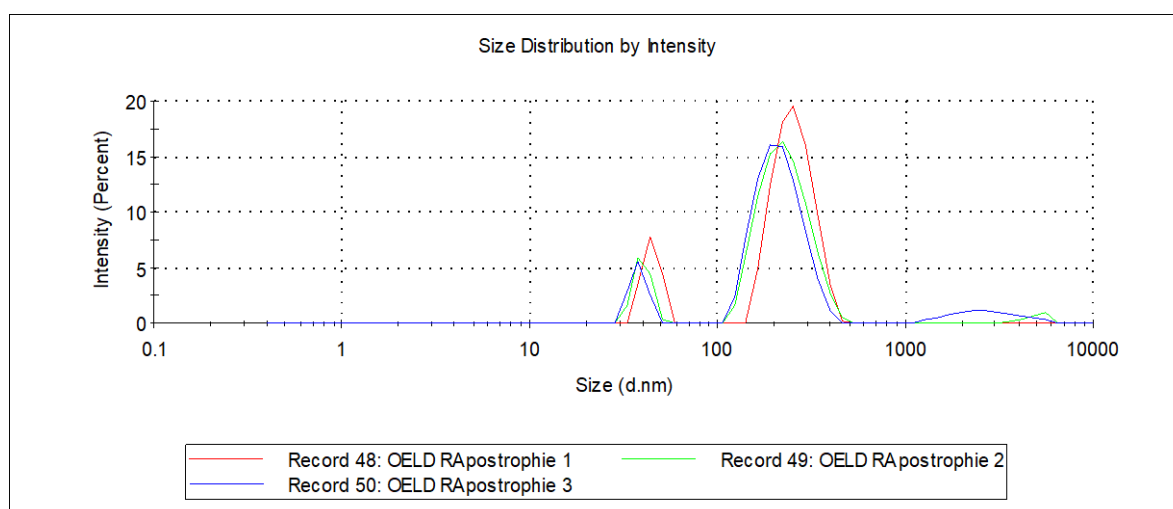


Figura 33. Distribuição do tamanho de gotícula da formulação preparada com o tensoativo Resassol[®] Apostrophie e óleo essencial da *L. dentata*.

Com base na análise estatística dos resultados, foi possível verificar, para a *L. angustifolia*, que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no tamanho de gotícula e no índice de polidispersão entre as formulações com as diferentes misturas de tensoativos testadas. Como o índice de polidispersão reflete a homogeneidade do

sistema em relação à distribuição média das gotículas, um baixo índice de polidispersão indica elevada homogeneidade, podendo sugerir uma melhor estabilidade.

Para a *L. dentata* foi possível constatar, estatisticamente, que também houve diferença significativa ($p < 0,05$), mas no tamanho de gotícula e no potencial Zeta entre as formulações com os diferentes pares de tensoativos testados. O potencial Zeta desempenha um papel importante na determinação da estabilidade de nanoemulsões. Valores próximos ou superiores a 30 mV, em módulo, indicam resistência à agregação das gotículas dispersas, pois as forças repulsivas da dupla camada atuam com maior intensidade do que as forças atrativas de Van der Waals, fazendo com que haja menor tendência à formação de floculado e/ou coalescência, demonstrando, conseqüentemente, maior estabilidade da formulação (FRIBERG; JANSSON; CEDERBERG, 1976; KONG; PARK, 2011).

Os tamanhos de gotículas encontrados não foram discutidos como um parâmetro importante para a determinação da mistura de tensoativos mais estável utilizada, indicando apenas que as formulações estão dentro da faixa nanométrica estabelecida para a definição de nanoemulsão.

Portanto, para uma posterior avaliação da estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas, a formulação escolhida para a *L. angustifolia* foi composta pelo par de tensoativo Sorbitan Oleate/Polysorbate 80, apresentando um tamanho médio de gotícula de $40,4 \pm 0,2$ nm, um índice de polidispersão de $0,166 \pm 0,008$ e um potencial Zeta de $-24,5 \pm 2,8$. Para a *L. dentata*, a formulação escolhida foi composta pelo tensoativo Resassol® Apostrophie, apresentando um tamanho médio de gotícula de $162,7 \pm 3,0$ nm, um índice de polidispersão de $0,356 \pm 0,047$ e um potencial Zeta de $-21,7 \pm 0,7$.

5.6. Avaliação da estabilidade física das formulações

5.6.1. Análise macroscópica

Todas as formulações foram avaliadas macroscopicamente durante os dias 1, 10, 14, 21 e 30 do teste de estabilidade. As nanoemulsões não apresentaram cremeação, separação de fase e/ou presença de sedimento, permanecendo estáveis ao longo dos 30 dias.

5.6.2. Determinação do valor do pH

A determinação do pH é importante em formulações de uso tópico, devendo apresentar valores compatíveis com os da pele, entre 4,0 - 6,5 (ISAAC et al., 2008; KASHIWABARA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2015).

Durante a avaliação da estabilidade, foi possível observar uma diminuição nos valores do pH, nas temperaturas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$, em ambas as formulações, contendo óleo essencial de *Lavandula angustifolia* com Span[®]/Tween[®] (LAST) e *Lavandula dentata* com Resassol[®] Apostrophie (LDRA), conforme a Figura 34, havendo diferença significativa dos valores finais em relação aos valores do dia 1 ($p < 0,05$).

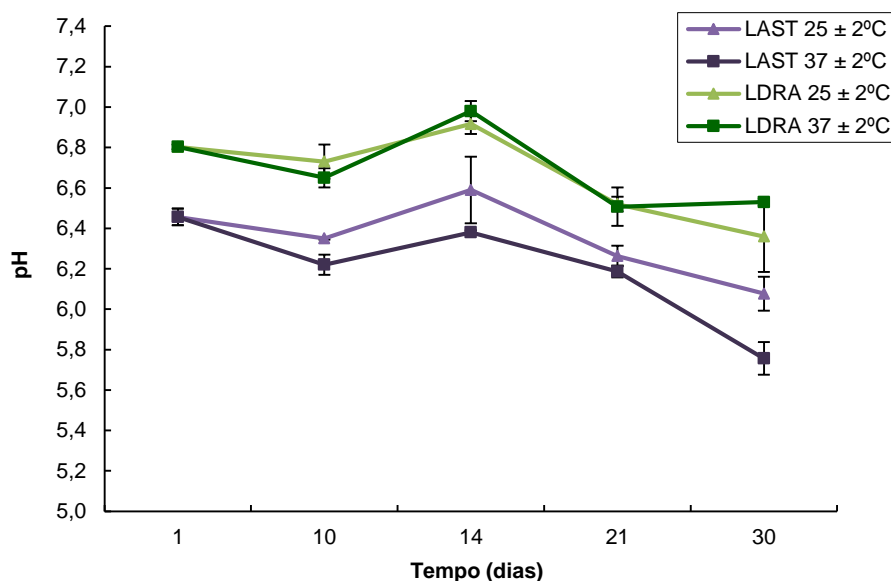


Figura 34. Valores de pH das nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$), durante os 30 dias de análise.

É possível observar também, que a formulação LDRA apresentou valores de pH acima dos valores compatíveis com os da pele, possivelmente, pela utilização do Resassol® Apostrophe, pois esse tensoativo, segundo o certificado de análise do fornecedor (Anexo 2), pode apresentar valores de pH entre 5,0 - 7,0.

Apesar dessas alterações, as nanoemulsões não apresentaram modificações macroscópicas ao longo dos 30 dias de armazenamento, indicando que as alterações no pH não influenciaram de forma negativa na estabilidade física das formulações.

5.6.3. Distribuição do tamanho de gotícula e potencial Zeta

Durante a avaliação da estabilidade, foi possível observar alterações nos valores do tamanho de gotícula, nas temperaturas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$, em

ambas as formulações, apresentando aumento significativo no tamanho de gotícula ($p < 0,05$) para a formulação LAST e diminuição significativa no tamanho de gotícula ($p < 0,05$) para a formulação LDRA. Os resultados estão representados na Figura 35.

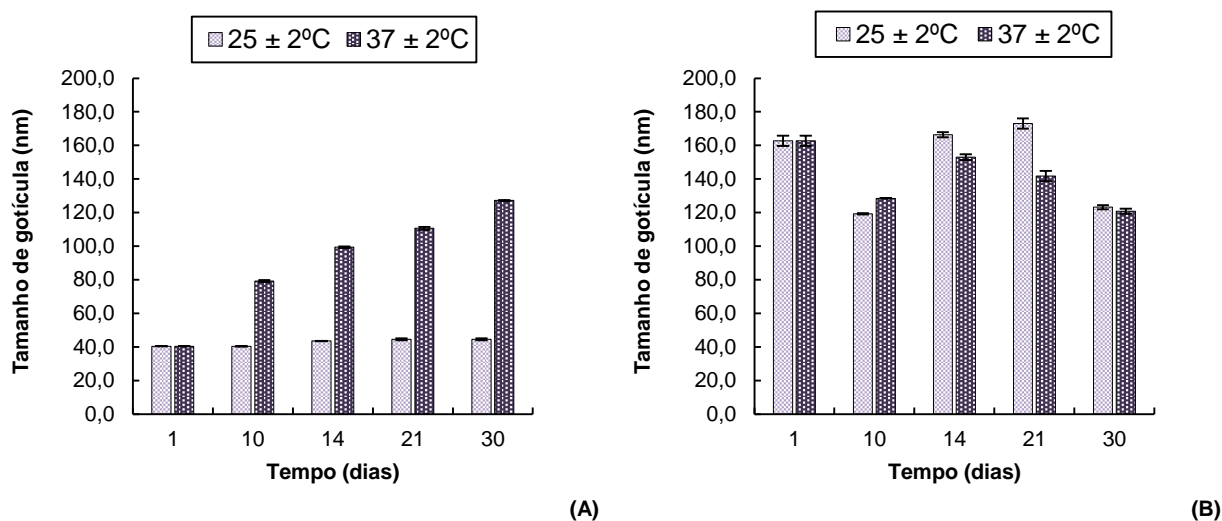


Figura 35. Distribuição do tamanho de gotícula das nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.

A análise do tamanho de gotícula é importante para a estabilidade das nanoemulsões, pois, devido ao movimento Browniano das gotículas, o pequeno tamanho permite a redução do efeito da gravidade sobre as formulações (KONG; PARK, 2011); no entanto, o fenômeno de *Ostwald ripening*, principal mecanismo de instabilidade, provoca o aumento no tamanho da gotícula, afetando a estabilidade do sistema, podendo resultar na separação de fases (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013; SHANMUGAM; ASHOKKUMAR, 2014).

Ao longo do tempo de armazenamento, não houve, macroscopicamente, sinais de instabilidade, como cremeação, separação de fases ou sedimentação,

podendo ser atribuído ao fato do tamanho de gotícula permanecer na escala nanométrica, durante o período de avaliação.

O aumento do tamanho de gotícula ocorrido na formulação LAST, pode estar relacionado, segundo Komaiko e McClements (2014), ao uso de tensoativos não iônicos, que são suscetíveis aos efeitos da temperatura. Um estudo utilizou os mesmos pares de tensoativos usados na formulação LAST e, também os autores, observaram um aumento significativo no tamanho de gotícula em temperatura mais elevada, apresentando separação de fases no 15º dia (SILVA *et al.*, 2016).

De acordo com Rocha-Filho *et al.* (2014), nanoemulsões obtidas com óleo de maracujá e incorporadas de óleo essencial de *Lavandula officinalis*, apresentaram alteração no tamanho das gotículas a $45 \pm 2^\circ\text{C}$, fato já esperado, uma vez que a temperatura aumenta a energia cinética do sistema. Além disso, a fase oleosa composta por um óleo volátil pode causar ruptura da interface por evaporação de suas moléculas, aumentando a possibilidade da ocorrência de fatores de instabilidade.

Em outro trabalho, realizado por Ševčíková *et al.* (2012), foi possível observar um aumento significativo do tamanho de gotícula em amostras armazenadas a 25°C ; porém, os autores consideraram estáveis, pois não apresentaram separação de fases, nem sinais de instabilidade macroscopicamente, confirmando com os resultados deste estudo para a formulação LAST.

Em contrapartida, Ribeiro *et al.* (2015) observaram em suas formulações uma redução significativa no tamanho de gotícula, quando submetidas à temperatura de 45°C , por um período de 60 dias. Esses autores também consideraram as nanoemulsões estáveis, por não apresentarem, macroscopicamente, modificações

quando comparadas às suas características iniciais. Portanto, a formulação LDRA, apesar da redução significativa no tamanho de gotícula, foi considerada estável.

Apesar do aumento significativo no tamanho de gotícula na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, para a formulação LAST, os valores finais do índice de polidispersão (Pdl) não foram alterados significativamente ($p > 0,05$) em relação aos valores iniciais (Figura 36). Saberi, Fang e McClements (2013) também observaram alterações significativas no tamanho de gotícula sem mudanças no Pdl, corroborando com os dados deste trabalho. No entanto, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de Pdl na temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Devido ao mecanismo de *Ostwald ripening*, o aumento significativo do tamanho de gotícula, aliado a uma redução dos valores de Pdl, podem sugerir a instabilidade da formulação; porém, por não apresentar alterações macroscópicas, a nanoemulsão LAST foi considerada estável.

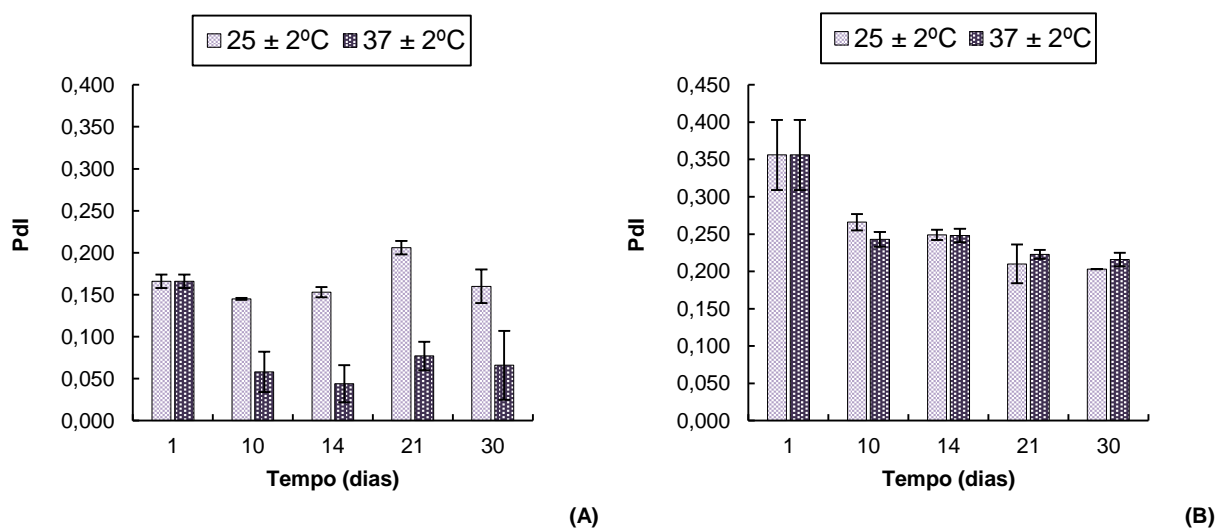


Figura 36. Valores do índice de polidispersão (Pdl) obtidos para as nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.

Em relação à formulação LDRA, foi possível observar, também, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de PDI, nas temperaturas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm 2^\circ\text{C}$; entretanto, não apresentou alterações macroscópicas, sendo considerada estável.

Os resultados do potencial Zeta (Figura 37) mostraram perfis diferentes para cada formulação estudada. Para a formulação LAST, os valores variaram entre $-25,8\text{mV}$ e $-21,4\text{mV}$, na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e entre $-24,5\text{mV}$ e $-19,4\text{mV}$, na temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, ao longo dos 30 dias. Segundo Shanmugam e Ashokkumar (2014), valores de potencial Zeta entre $|25\text{mV}|$ e $|30\text{mV}|$ são suficientes para a formação de uma barreira energética, evitando a coalescência. Apesar dos valores encontrados, para a formulação LAST, estarem abaixo do mencionado por esses autores, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores finais em relação aos valores iniciais, além da nanoemulsão não sofrer alterações macroscópicas.

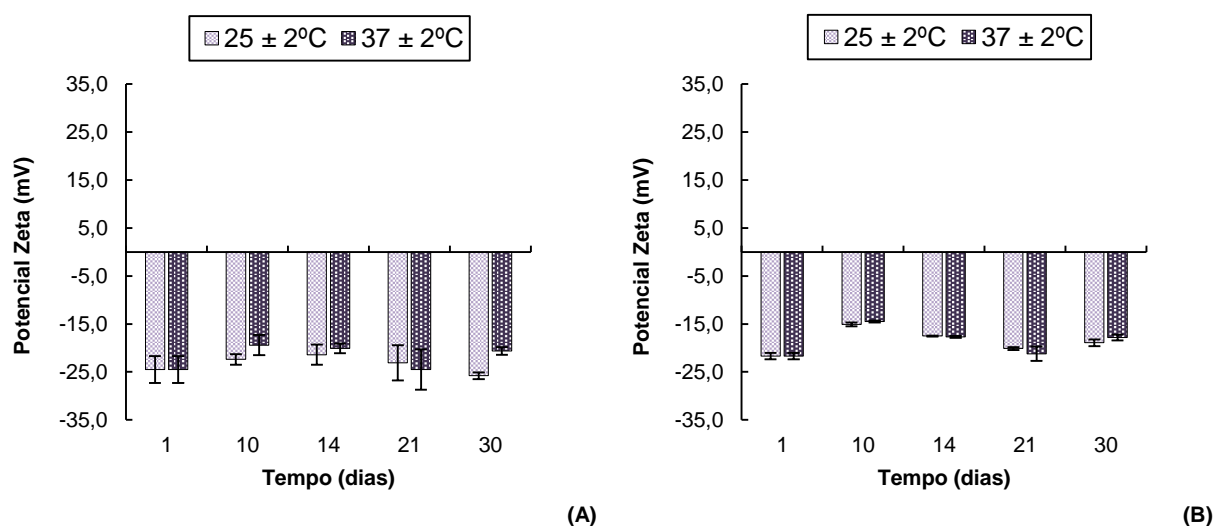


Figura 37. Valores de potencial Zeta obtidos para as nanoemulsões contendo óleo essencial de lavanda, após diferentes condições de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $37 \pm$

2°C), durante os 30 dias de análise: (A) resultados obtidos para a formulação LAST e (B) resultados obtidos para a formulação LDRA.

Para a formulação LDRA, os valores variaram entre -21,7mV e -15,1mV, na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e entre -21,7mV e -14,5mV, na temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, ao longo dos 30 dias, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) em ambas as condições de armazenamento.

Esses valores de potencial Zeta, obtidos para a formulação LDRA, também se encontram abaixo de -25mV. Segundo Maruno e Rocha-Filho (2010), a diminuição no potencial Zeta pode gerar problemas na estabilidade das nanoemulsões, relatando um aumento na tendência a floculação. Porém, apesar dessa diminuição, a formulação LDRA não apresentou alterações macroscópicas, sendo considerada estável até o final da avaliação.

6. CONCLUSÕES

Na caracterização química dos OEs foi possível identificar 1,8-cineol e cânfora como substâncias majoritárias das duas espécies de lavanda.

Os OEs apresentaram atividade antioxidante no sequestro do radical DPPH•, porém são necessárias concentrações superiores que as do ácido gálico para apresentar a mesma atividade. Da mesma forma para o radical ABTS•+, sendo necessárias concentrações maiores de OEs, em relação à metodologia do radical DPPH•, para apresentar atividade antioxidante.

Os resultados do ensaio da citotoxicidade mostraram que os OEs, quando usados na concentração de 0,156%, não foram citotóxicos para a linhagem HDFa. Para as linhagens HaCat e HepG2, não foi possível encontrar os valores de EC₅₀, sugerindo a citotoxicidade dos OEs para essas células.

Na avaliação do estímulo da produção de colágeno, foi possível constatar que não houve estímulo da produção de colágeno dos OEs em relação ao controle negativo.

Também foi possível obter formulações com pequeno tamanho de gotícula, baixo índice de polidispersão e potencial Zeta próximo do valor indicativo de estabilidade máxima, sendo consideradas estáveis por um período de 30 dias, em diferentes temperaturas de armazenamento.

Portanto, foi possível concluir que os OEs foram seguros em concentração menor que 0,156% e eficazes, como antioxidantes, proporcionando o desenvolvimento de nanoemulsões estáveis, de acordo com os ensaios realizados.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.1 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2017.
- ADJONU, R. et al. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v. 122, p. 15–27, 2014.
- ALMEIDA, M. G. J. DE. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.
- AMADEU, T. P. et al. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 2, n. 2, p. 60–68, 2003.
- ARAÚJO, F. A. et al. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 238-245, 2011.
- ARCHANA, D.; DUTTA, J.; DUTTA, P. K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 193–203, 2013.
- ASDADI, A. et al. Reveal antifungal activities of essential oils from *Lavandula dentata* L. a way of valuing the arganeraie. **Der Pharma Chemica**, v. 8, n. 3, p. 249-253, 2016.
- AZULAY, R. D. **Dermatologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BAJERSKI, L. *et al.* The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347–363, 2016.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BARIL, M. B. *et al.* **Nanotecnologia aplicada aos cosméticos**. v. 13, n. 1, p. 45–54, 2012.

BASCH, E. *et al.* Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 4, n. 2, p. 63–78, 2004.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

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

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BURT, S. A. *et al.* Increase in activity of essential oil components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 919–926, 2005.

BUSATO, N. V. *et al.* Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574–1582, 2014.

CAO, M. *et al.* Gold nanomaterials in consumer cosmetics nanoproducts: analyses, characterization, and dermal safety assessment. **Small**, v. 12, n. 39, p. 5488–5496, 2016.

CARDIA, G. F. E. *et al.* Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on acute inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

CASTRO, A. C. C. M. *et al.* Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48–57, 2018.

CAVANAGH, H. M. A.; WILKINSON, J. M. Biological activities of Lavender essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 4, p. 301–308, 2002.

CHAUDHRI, N.; SONI, G. C.; PRAJAPATI, S. K. Nanotechnology: an advance tool for nano-cosmetics preparation. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 4, n. 4, p. 28–40, 2015.

CHIARI, B. G. *et al.* Cosmetics' Quality Control. *In*: AKYAR, I. (Ed.). **Latest Research into Quality Control**. [s.l.]: InTech, 2012b.

CHIARI, B. G. *et al.* Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323–330, 2012a.

CHIARI, B. G. *et al.* Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 389–393, 2014.

CHIARI, B. G. *et al.* Use of hepg2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**. v. 2, n. 2, p. 8-14, 2012c.

CORRÊA, A. L. **Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade neutralizante de *Myrsine parvifolia* sobre atividades biológicas provocadas pela peçonha de**

Bothrops sp. 2017. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

CORRÊA, M. A. **Cosmetologia: ciência e técnica**. 1. ed. [S.I.] Editora Medfarma, 2012.

DAGLI, N. *et al.* Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: a review. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 335, 2015.

DANH, L. T. *et al.* Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by Supercritical CO₂, Hexane and Hydrodistillation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3481–3489, 2013.

DAUDT, R. M. *et al.* A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 28–31, 2013.

DEMARCO, F. F. *et al.* Avaliação da citotoxicidade de dois sistemas adesivos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 375–382, 1998.

DENNER, S. S. *Lavandula Angustifolia* Miller: English Lavender. **Holistic Nursing Practice**, v. 23, n. 1, p. 57–64, 2009.

DUARTE, J. L. *et al.* Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189-192, 2015.

EPSTEIN, F. H.; SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

FARAHPOUR, M. R. *et al.* Topical application of lavender officinalis hydroethanolic extract, improves excisional cutaneous wound healing in experimental animals. v. 4, n. 3, p. 1219–1228, 2015.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, 2017.

FERNANDES, C. P. *et al.* Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 22, 2014.

FERNANDES, C. P. *et al.* HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 108–114, 2013.

FERNANDEZ, P. *et al.* Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, 2004.

FERRARI, M. *et al.* Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 626–30, 2007.

FIGUEIREDO, B. K. *et al.* Emprego da nanotecnologia em cosméticos: vantagens e riscos associados. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 99, n. 3, p. 2912–2929, 2018.

FORGIARINI, A. *et al.* Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 115, p. 36–39, 2000.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

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

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 3, p. 112–113, 2010.

FRIBERG, S.; JANSSON, P. O.; CEDERBERG, E. Surfactant association structure and emulsion stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 55, n. 3, p. 614-623, 1976.

GANESAN, P.; CHOI, D. K. Current application of phytocompound-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1987, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206, 2007.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67–71, 2003.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88, n. 2, p. 53–8, 2007.

IMELOUANE, B. *et al.* Chemical composition, cytotoxic and antioxydant activity of the essential oil of *Lavandula dentata*. **World Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 103–110, 2010.

IMELOUANE, B. *et al.* Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 2, p. 6, 2009.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

JORGE, M. P. *et al.* Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 361–366, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KASHIWABARA, T. B. *et al.* **Medicina ambulatorial IV com ênfase em dermatologia**. Montes Claros: Dejan Gráfica e Editora, 2016.

KATOAKA, V. Y.; AUDI, C.; ZYCHAR, B. C. A prospecção da nanotecnologia cosmética no setor da estética e suas principais nanoestruturas. **São Paulo**, v. 4, n. 4, p. 2–19, 2016.

KATZ, L. M.; DEWAN, K.; BRONAUGH, R. L. Nanotechnology in cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1–11, 2015.

KLANG, V. *et al.* Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 425, p. 59–66, 2014.

KONG, M.; PARK, H. J. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1303-1310, 2011.

- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, p. 355-367, 2011.
- LEFEVRE, L. *et al.* Development of quercetin based nanodispersions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2051–2056, 2016.
- LEONG, W. F. *et al.* Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 77–83, 2011.
- LIM, T. K. *Lavandula dentata*. In: LIM, T. K. (Ed.). **Edible medicinal and non medicinal plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 186–191.
- LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 02, n. 05, p. 626–639, 2011.
- LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. A comparison of wound healing following treatment with *Lavandula x allardii* honey or essential oil. **Phytotherapy Ressorce**, v. 20, n. 9, p. 755–757, 2006.
- MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105–127, 2011.
- MACHADO, M. P. *et al.* Propagação in vitro e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 283–289, 2013.
- MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’Être” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231–241, 2003.
- MANTLE, D. *et al.* Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 4, p. 385–391, 1998.

MANTOVANI, A. L. L. *et al.* Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 6, p. 877–884, 2013.

MARCATO, P. D. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, 2009.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Tecidos vivos: a pele**. *In*: _____. **Anatomia e fisiologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W Nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 17–22, 2009.

MASETTO, M. A. M. *et al.* Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2011.

MASON, T. G. *et al.* Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MCGEE, H. M. *et al.* IL-22 Promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1321–1329, 2013.

MELO, A. *et al.* The role of nanomaterials in cosmetics: national and internacional legislative aspects. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 599–603, 2015.

MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização.

Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, 2016.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. v. 26, n. 2, p. 9, 2004.

MONTENEGRO, L. *et al.* From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100–112, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MSAADA, K. *et al.* Essential oil composition of *Lavandula dentata*, *L. stoechas* and *L. multifida* cultivated in Tunisia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 6, p. 1030–1039, 2012.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of nanotechnology in cosmetics. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1746–1749, 2010.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.

OKONOGLI, S. *et al.* Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839–846, 2007.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. *et al.* Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145835, 2016.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. *et al.* *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, 2017.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. *et al.* Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Chemical and Biological Investigations of *Pilocarpus spicatus* essential oils. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 3, p. 206–211, 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M.; DIAS, R. V. DA C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 241–249, 2002.

PDQ® Screening and Prevention Editorial Board. **PDQ Skin Cancer Screening**. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/skin/patient/skin-screening-pdq>>. Acesso em: 12 fev. 2019. [PMID: 26389182]

PEANA, A. T. *et al.* Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 721-726, 2002.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results.

Food Research International, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PISCOPO, M. R. *et al.* O setor brasileiro de nanotecnologia: oportunidades e desafios. **Revista de Negócios**, v. 19, n. 4, p. 43, 2015.

PIZZOFERRATO, A. *et al.* Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical Materials**, v. 15, n. 3, p. 173–190, 1994.

PRAKASH, R. T.; THIAGARAJAN, P. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 01–13, 2011.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 3, p. 221-229, 2004.

RAJ, S. *et al.* Nanotechnology in cosmetics: opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186, 2012.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RES PHARMA. **Technical data sheet: Resassol® Apostrophie**. RES Pharma Industriale, Milano. 2018. Disponível em: <www.respharma.com>. Acesso em: 03 mar. 2018.

RIBEIRO, H. M.; MORAIS, J. A.; ECCLESTON, G. M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, n. 2, p. 47-59, 2004.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extract as moisturizing agent. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2492-2509, 2015.

ROCHA-FILHO, P. A. *et al.* Influence of Lavander Essential Oil Addition on Passion Fruit Oil Nanoemulsions: Stability and *in vivo* Study. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 02, 2014.

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 95-102, 2013.

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

ŠEVČÍKOVÁ, P. *et al.* On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 410, p. 130–135, 2012.

SHANMUGAM, A.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems - Physicochemical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 151–162, 2014.

SHOKRI, A. *et al.* Antileishmanial activity of *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus Officinalis* essential oils and nano-emulsions on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 12, n. 4, p. 10, 2017.

SILVA, A. L. *et al.* Stearylamine-containing cationic emulsion as a promising carrier for gene delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1339-1345, 2016.

SILVA, G. L. D. *et al.* Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1397-1408, 2015.

SILVA-FLORES, P. G. *et al.* Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, p. 1-9, 2019.

SILVEIRA, J. C. *et al.* Proposta de modelagem da extração de óleos essenciais utilizando modelo a parâmetros distribuídos na fase sólida. **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, v. 16, 2012b.

SILVEIRA, S. M. *et al.* Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 3, p. 462–470, 2012a.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.

SINGH, P.; NANDA, A. Nanotechnology in cosmetics: a boon or bane? **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 8, p. 1467–1479, 2012.

SMIGIELSKI, K. *et al.* Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* cultivated in Poland. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 3, p. 338–347, 2009.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SOLÉ, I. *et al.* Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 133–139, 2012.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 03, p. 202-210, 2011.

SOUZA, V. B. *et al.* Stability of Orange Oil/Water Nanoemulsions Prepared by the Pit Method. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2237–2243, 2011.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability: Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: COLIGAN, J. E. *et al.* (Eds.). **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. A3.B.1-A3.B.3.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TANG, R.; JI, W.; WANG, C. Synthesis and characterization of new poly (ortho ester amidine) copolymers for non-viral gene delivery. **Polymer**, v. 52, n. 4, p. 921-932, 2011.

THAKUR, N. *et al.* Nanoemulsions: a review on various pharmaceutical application. v. 6, n. 3, p. 222–225, 2012.

TOFETTI, M. H. F. C.; OLIVEIRA, V. R. A importância do uso do filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. v. 6, n. 1, p. 59–66, 2006.

TOUATI, B. *et al.* Chemical composition of the leaf and flower essential oils of Tunisian *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 8, p. 1560–1569, 2011.

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. *Lavandula angustifolia*. Disponível em: <<http://tropicos.org/Image/6334>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

TURGUT, A. C. *et al.* Chemical characterization of *Lavandula angustifolia* Mill. as a phytocosmetic species and investigation of its antimicrobial effect in cosmetic products. **Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 283–298, 2017.

VAKILIAN, K. *et al.* Healing advantages of lavender essential oil during episiotomy recovery: a clinical trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 17, n. 1, p. 50–53, 2011.

VERMA, R. *et al.* Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 3, p. 343–348, 2010.

WADHWA, G. *et al.* Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 39–58, 2017.

WANG, L. *et al.* Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 443–448, 2009.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. S98–S110, 2006.

WIROHADIDJOJO, Y. W.; TRISNOWATI, N.; BUDIYANTO, A. Collagen deposition and cellular viability among UVB irradiated human dermal fibroblasts treated by platelets. **Journal of Clinical Medicine and Research**, v. 4, n. 2, 2012.

WORONUK, G. *et al.* Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 01, p. 7–15, 2011.

YANG, S.-A. *et al.* Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. **Natural Product Research**, v. 24, n. 2, p. 140–151, 2010.

YUKUYAMA, M. N. *et al.* Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 13-24, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, jan. 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 - Laudo da extração dos óleos essenciais da *L. angustifolia* e *L. dentata*.



Laudo das extrações realizadas no Lavandário referente à matéria-prima que serviu de base para o estudo da mestrandia Bruna Figueiredo.

Atestamos que os óleos essenciais usados nesse trabalho foram extraídos de talhões da plantação de lavanda existente no Lavandário.

A técnica usada inicia-se com a poda manual, e nesse processo são podadas o terço superior da planta com a colheita das flores, das folhas e dos caules desse conjunto. O sistema de extração do óleo é por arraste a vapor e em nossa propriedade o equipamento utilizado tem capacidade para até 100 kg de massa verde, com uma caldeira de 50 litros.

Dos lotes estudados informamos:

Lote: 128

Lavanda angustifolia Grosso ou Lavandim (planta híbrida resultado do enxerto da lavanda latifolia em uma variedade da *Lavanda angustifolia*), as mudas só se reproduzem por estacas.

Data da destilação: 3 de agosto 2017

Neste lote foram podados 165 pés (1/3 superior da planta) que resultaram em 80 kg de massa verde, que rendeu 3,1125 ml de óleo essencial por pé.

Lote: 355

Lavanda dentata

Destilação: 8 de agosto de 2017

Neste lote foram podados 82 pés que renderam 80 kg de massa verde (flores, folhas e caules) com um rendimento de 6,25 ml de óleo essencial por pé.

Essas informações foram coletadas em nossa ficha de destilação, e essas fichas são geradas e guardadas de todos os lotes que processamos. Caso haja necessidade de verificação, nossas informações estão à disposição.

Fernanda Freire

ANEXO 2 - Certificado de análise do tensoativo Resassol® Apostrophie.

CERTIFICATE OF ANALYSIS



Product: Resassol Apostrophie
Batch No.: 21819853-18202815
Manufacture date: 20/04/2018
Retest: 20/05/2019
Expiry date: 20/10/2019

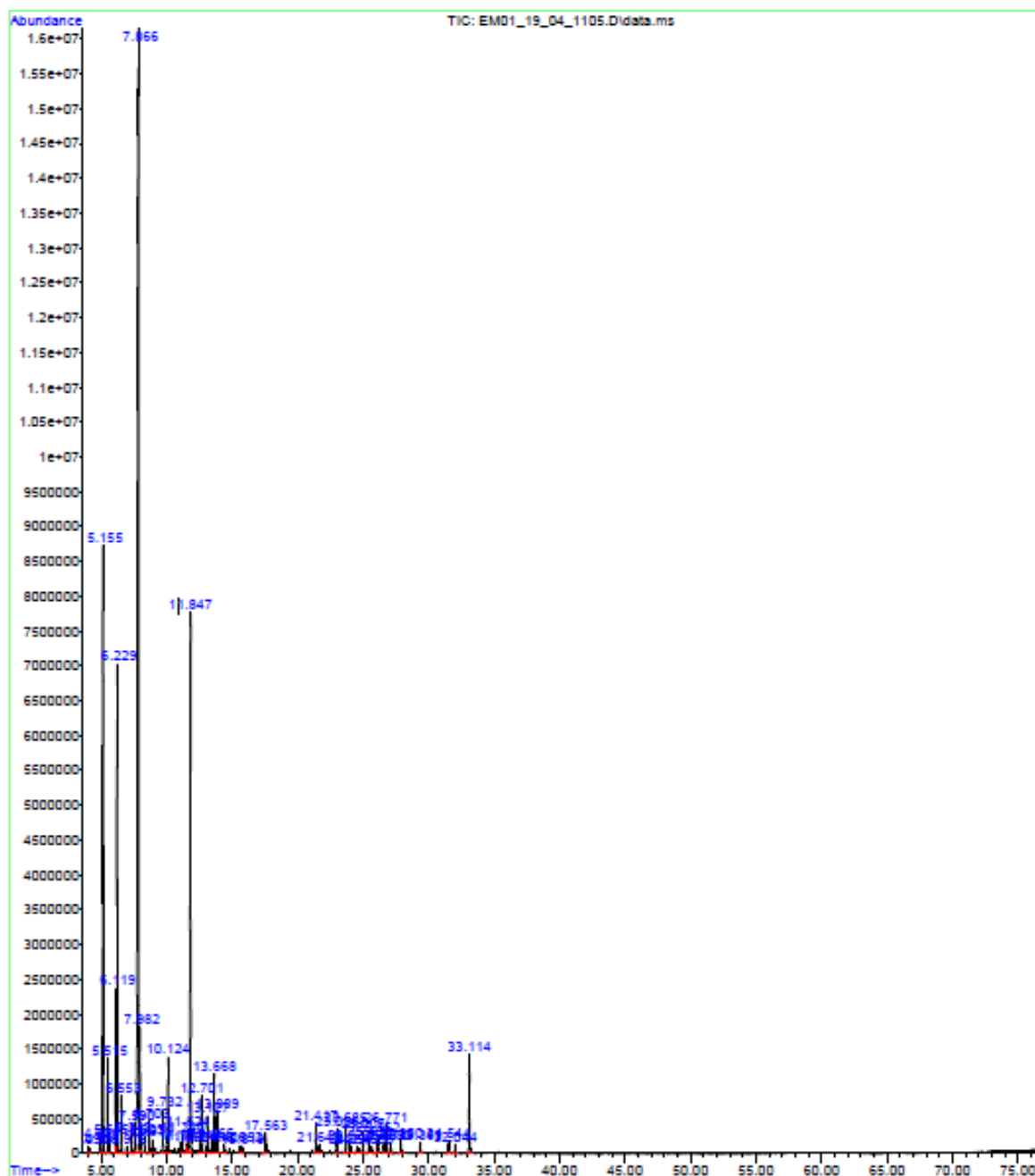
**PRODUCT
INFORMATION**

Analytical Tests	Specifications	Results
Appearance	From clear to slightly cloud liquid	Complies
Colour	From yellow to brown	Complies
Appearance of solution in water	Clear liquid	Complies
pH (5% in water)	5,0-7,0	6,10
Density	1,1000-1,2000	1,1230

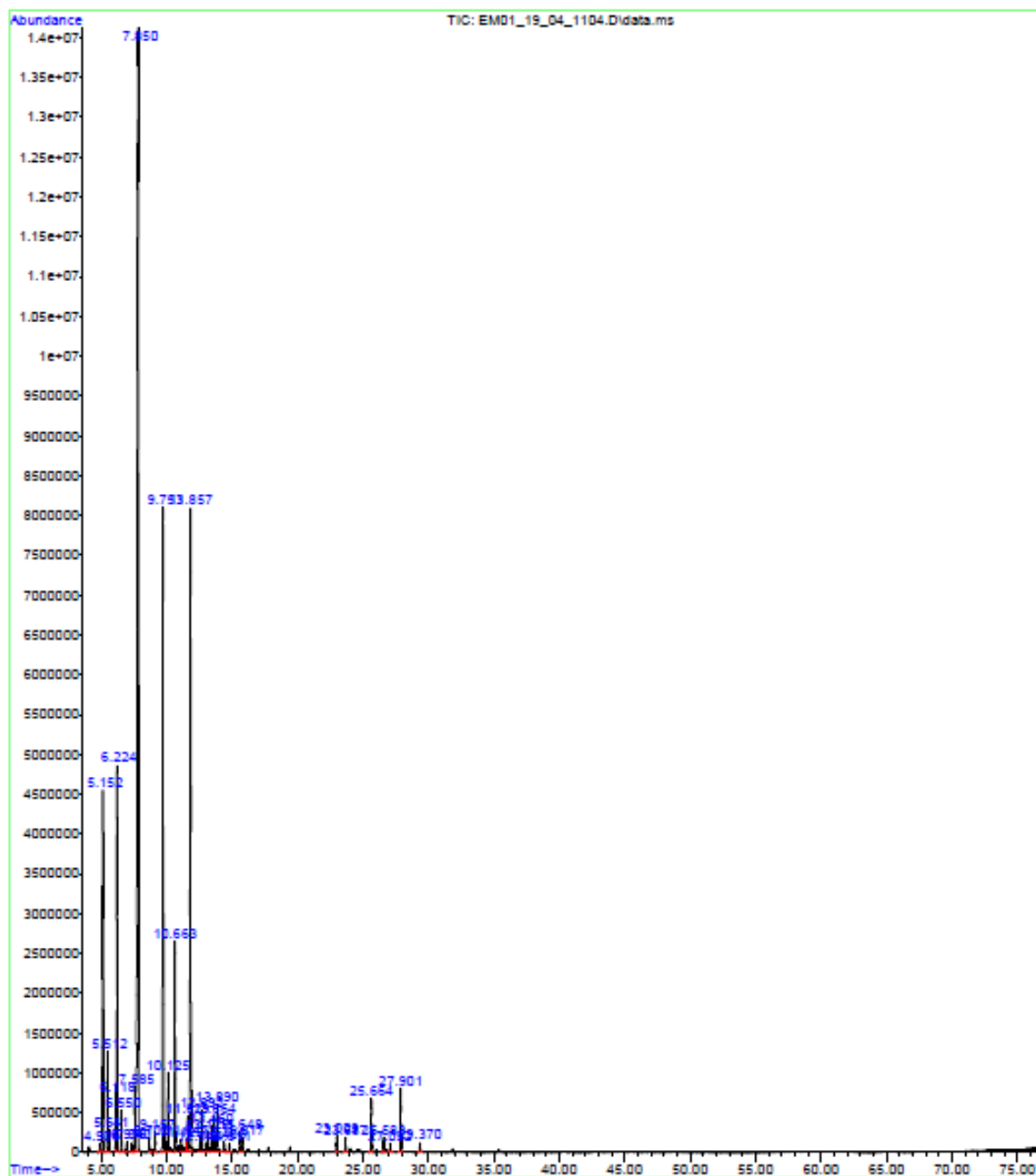


APÊNDICES

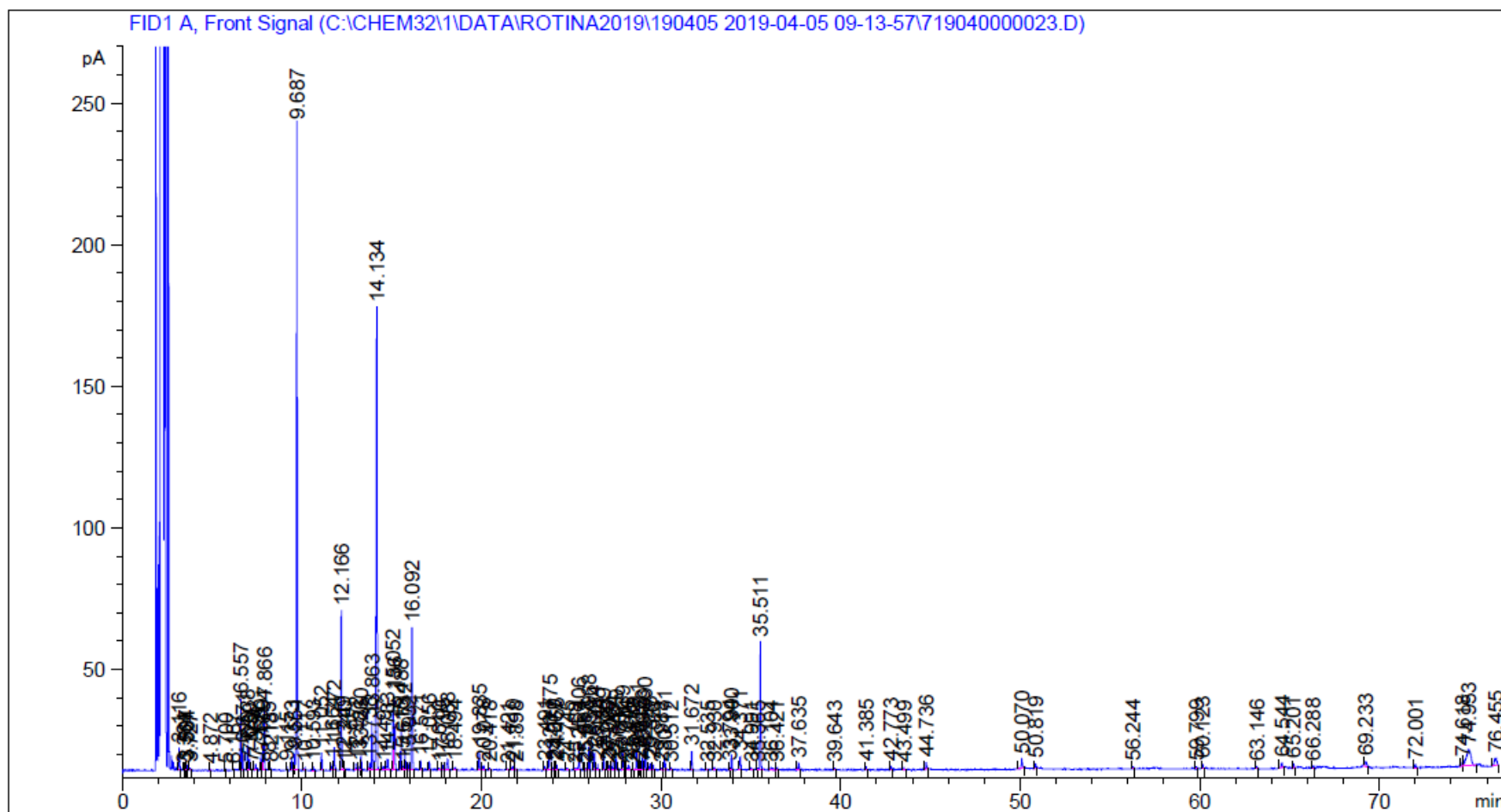
APÊNDICE 1 - Cromatograma do óleo essencial da *L. angustifolia*, obtido por CG-EM nas condições analíticas descritas no item 4.2.



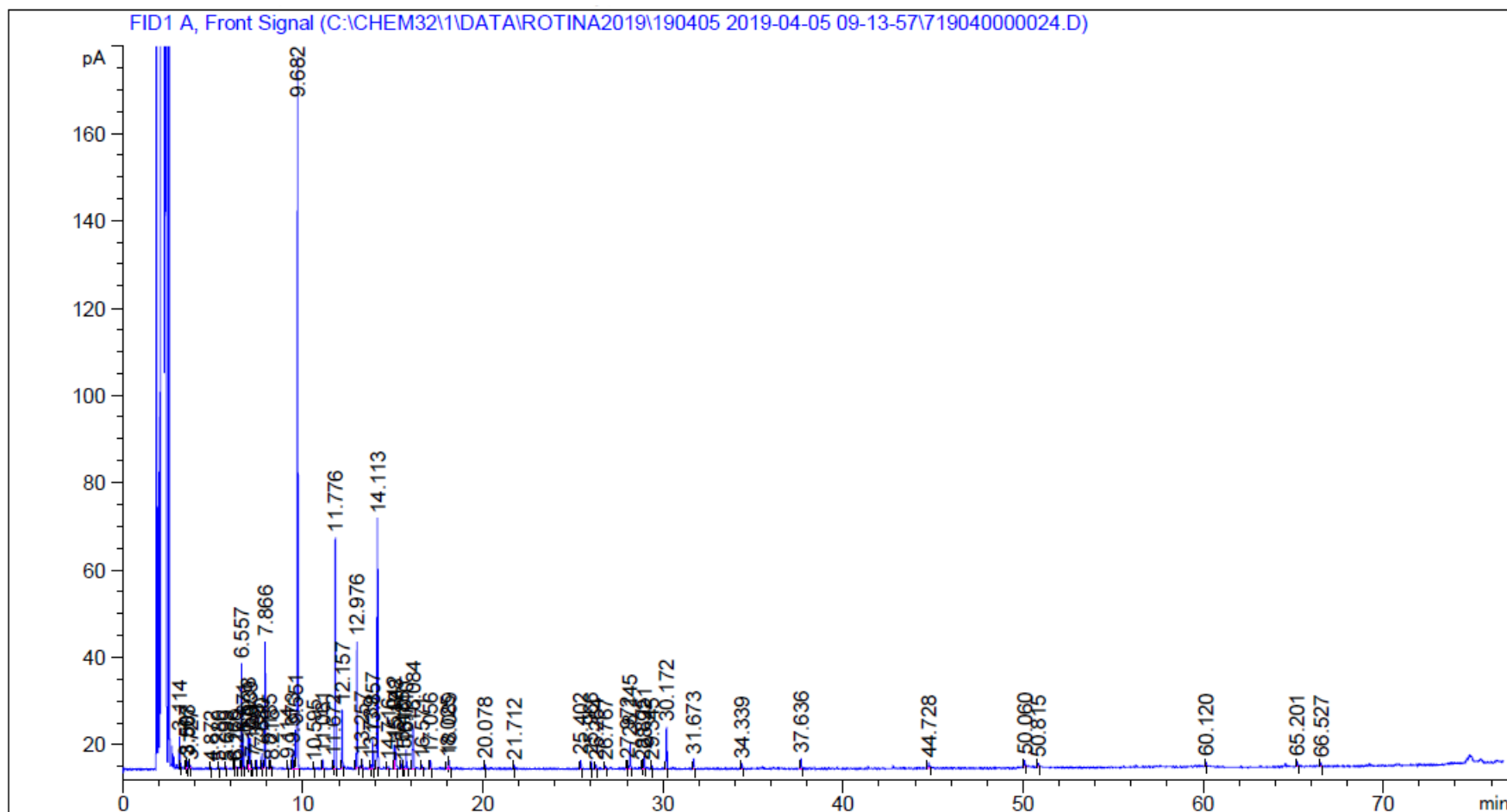
APÊNDICE 2 - Cromatograma do óleo essencial da *L. dentata*, obtido por CG-EM nas condições analíticas descritas no item 4.2.



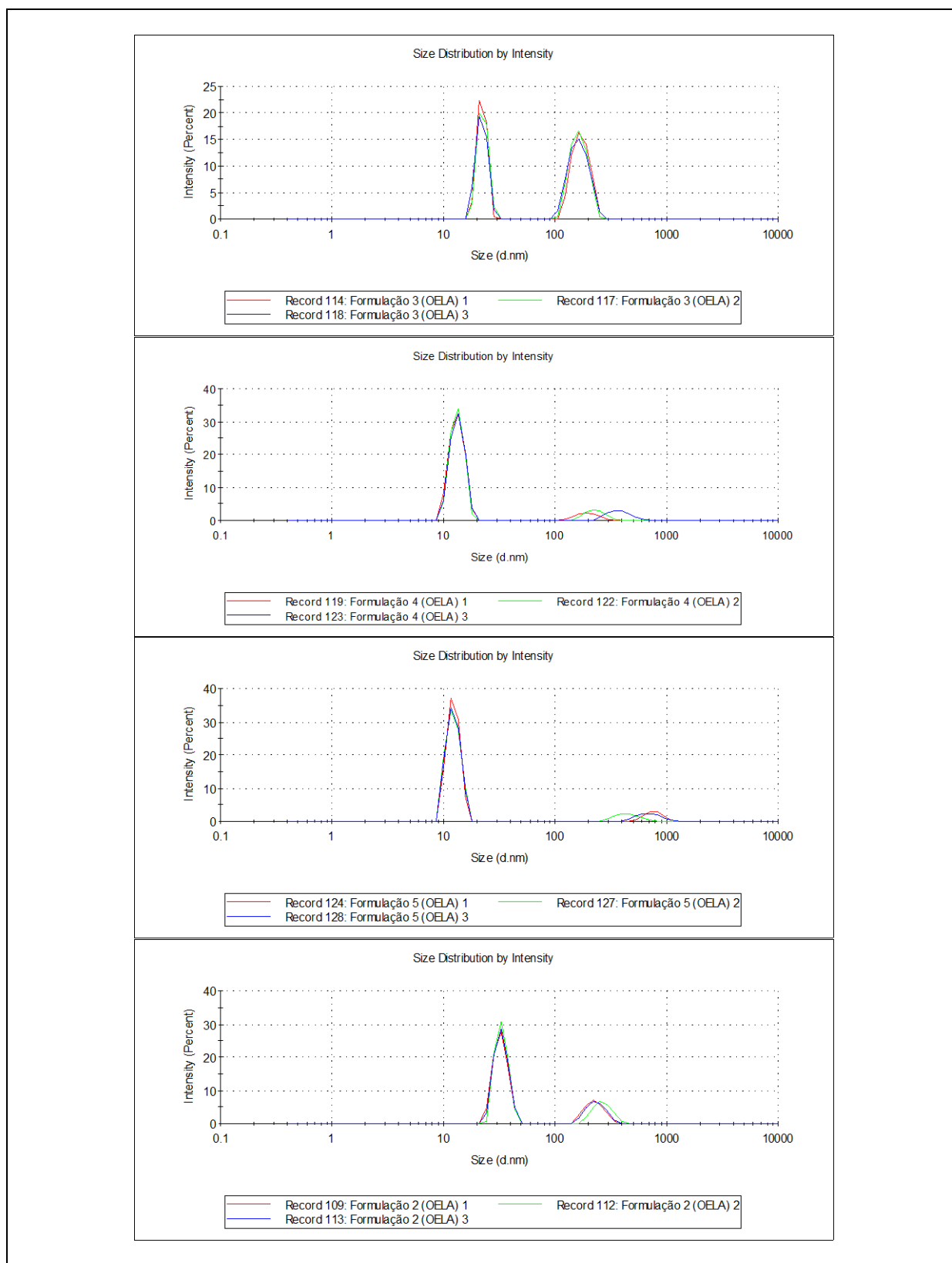
APÊNDICE 3 - Cromatograma do óleo essencial da *L. angustifolia*, obtido por CG-DIC nas condições analíticas descritas no item 4.2.



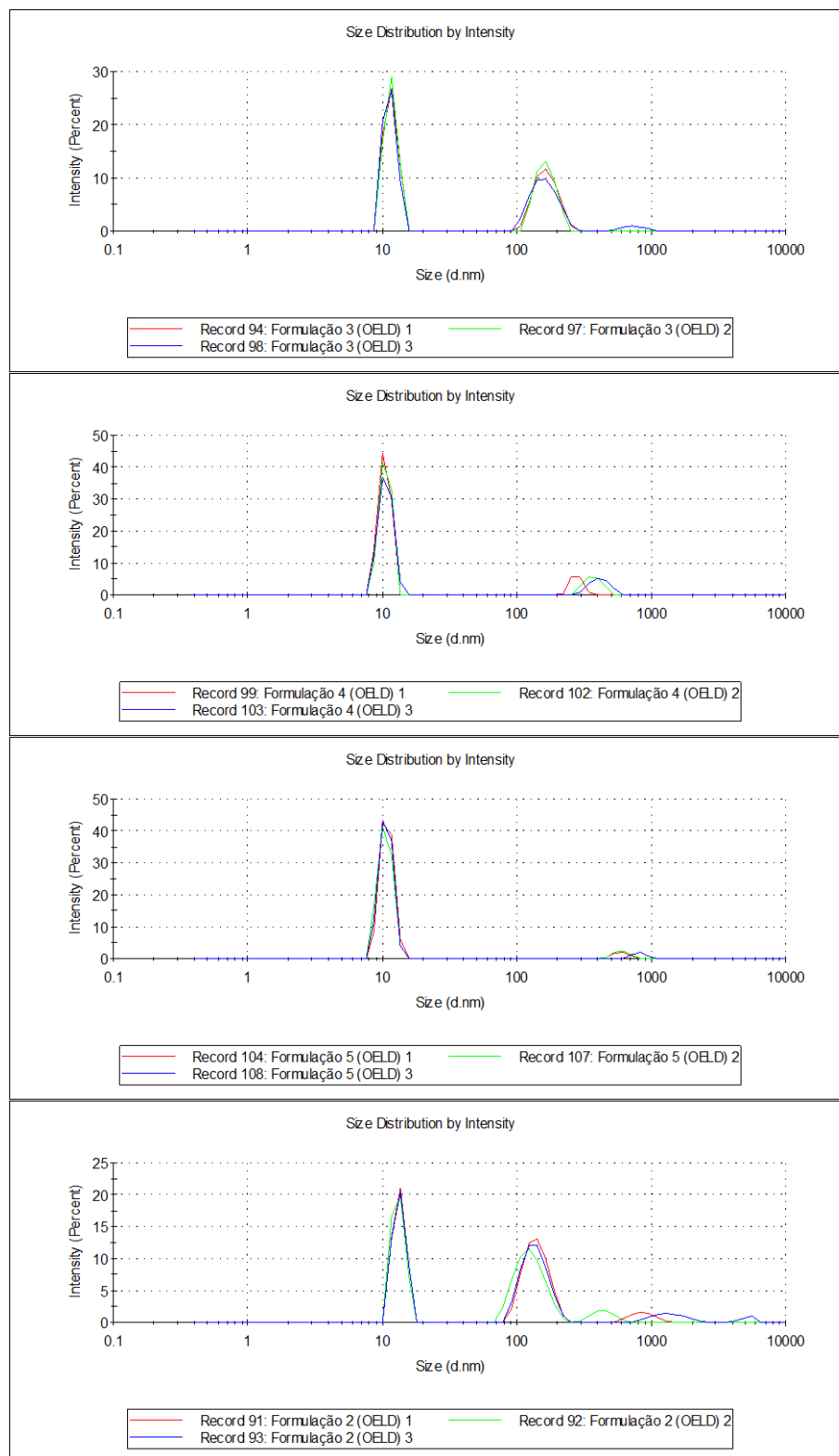
APÊNDICE 4 - Cromatograma do óleo essencial da *L. dentata*, obtido por CG-DIC nas condições analíticas descritas no item 4.2.



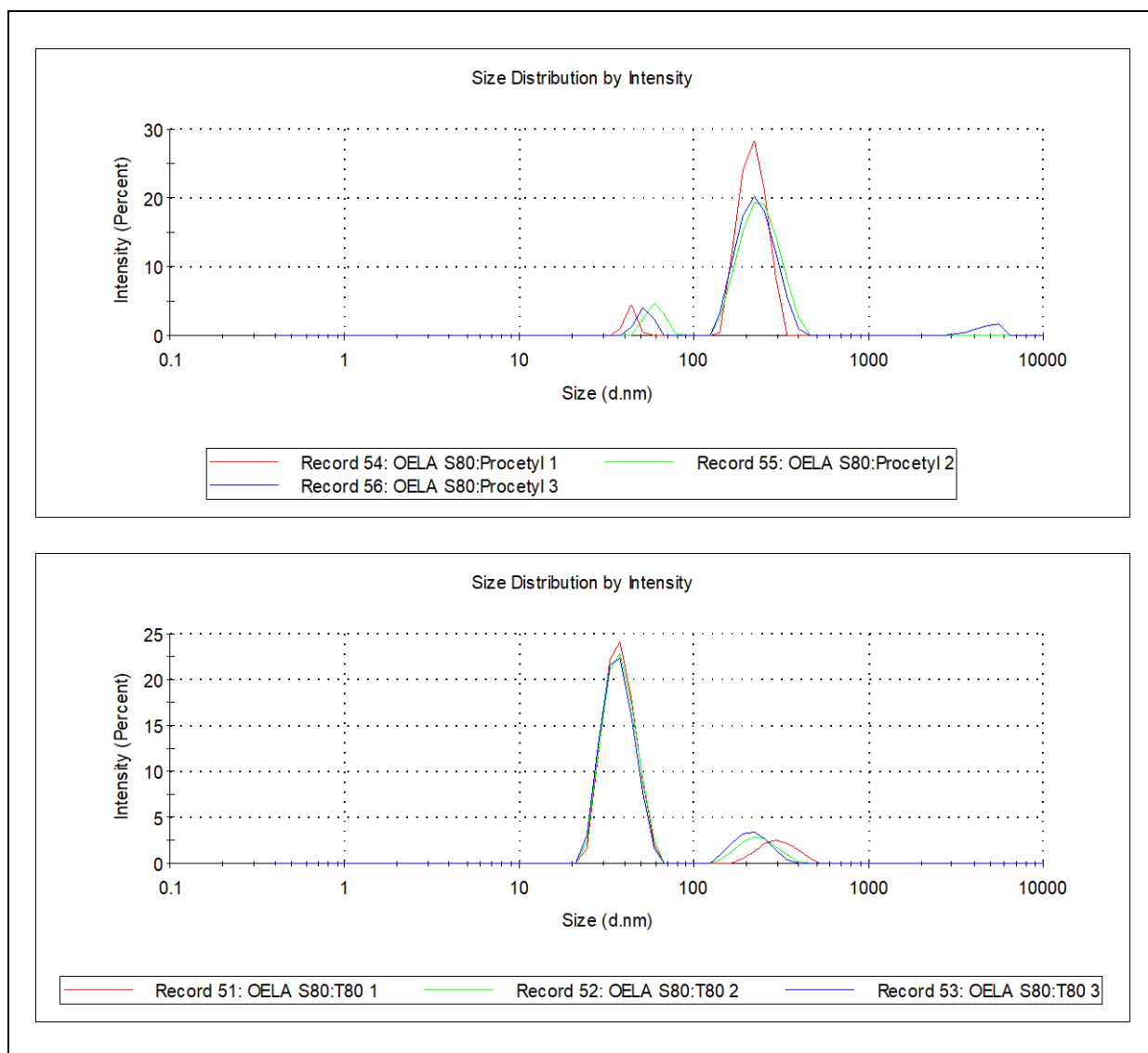
APÊNDICE 5 - Distribuição do tamanho de gotícula das formulações preparadas com diferentes porcentagens dos componentes com o óleo essencial da *L. angustifolia*.



APÊNDICE 6 - Distribuição do tamanho de gotícula das formulações preparadas com diferentes porcentagens dos componentes com o óleo essencial da *L. dentata*.



APÊNDICE 7 - Distribuição do tamanho de gotícula das formulações preparadas com diferentes misturas de tensoativos com o óleo essencial da *L. angustifolia*.



APÊNDICE 8 - Distribuição do tamanho de gotícula das formulações preparadas com diferentes misturas de tensoativos com o óleo essencial da *L. dentata*.

