



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GRAZIELLY CARDOSO LIMA

**EMULSÕES COM COLÁGENO EXTRAÍDO DE RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO
DE TILÁPIA COM EXTRATO DE *Phyllanthus niruri* COM PROPRIEDADE
ANTIOXIDANTE**

FORTALEZA

2018

GRAZIELLY CARDOSO LIMA

EMULSÕES COM COLÁGENO EXTRAÍDO DE RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DE
TILÁPIA COM EXTRATO DE *Phyllanthus niruri* COM PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida
Fechine

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L698e Lima, Grazielly Cardoso.

Emulsões com colágeno extraído de resíduo do beneficiamento de Tilápia com extrato de *Phyllanthus niruri* com propriedade antioxidante / Grazielly Cardoso Lima. – 2018.
79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.

1. *Phyllanthus niruri*. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Colágeno. I. Título.

CDD 540

GRAZIELLY CARDOSO LIMA

EMULSÕES COM COLÁGENO EXTRAÍDO DE RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DE
TILÁPIA COM EXTRATO DE *Phyllanthus niruri* COM PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 27 /07/ 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Gicélio e Rocilene Lima, por sempre acreditarem no meu potencial e sonharem meus sonhos, e a minha irmã, Gizelly Lima, minha melhor amiga, não estaria aqui se não fosse pela sua ajuda.

À Universidade Federal do Ceará, por ter proporcionando grandes oportunidades na minha vida acadêmica e profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Embrapa, instituição que apoiou a presente proposta de projeto de dissertação quanto ao seu desenvolvimento com base nas ações de cooperação técnica entre Embrapa Agroindústria Tropical por meio do seu Laboratório de Tecnologia da Biomassa – LTB -, com o Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará – UFC -, sendo as atividades de dissertação desenvolvidas como parte integrante das ações do projeto “Embrapa–BNDES - Ações estruturantes e inovação para o fortalecimento das cadeias produtivas da Aquicultura no Brasil”, contemplando o apoio institucional e financeiro necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus orientadores Men de Sá e Pierre Fachine, sempre solícitos a me ajudar e a compartilhar conhecimento.

Ao Dr. Guilherme Zocolo, parceiro neste trabalho, com todo conhecimento e paciência comigo.

À Daniele, minha estagiária, não seria possível sem seu esforço, esse trabalho é nosso.

Ao Lucas, Thiago e Katielle, meus amigos distantes, porém presentes em todas as horas.

Aos meus amigos de graduação, mais que amigos, uma família.

RESUMO

As emulsões são sistemas constituídos por dois líquidos imiscíveis, termodinamicamente instáveis e com diâmetro de partícula maior que 200 nm. Devido a propriedades sensoriais agradáveis como, baixa irritabilidade, ótima hidratação, espalhabilidade, além de maior penetração dos ativos na pele, elas têm atraído a atenção de vários ramos de estudo. Sendo assim, este trabalho objetiva formular e caracterizar emulsões de colágeno extraído de resíduos do beneficiamento de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para incorporação de extrato aquoso de folhas secas de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). O colágeno foi extraído das escamas desmineralizadas de Tilápia pelo método enzimático e o extrato aquoso de quebra-pedra foi obtido das folhas secas utilizando extrator acelerado por solvente pressurizado (ASE). Emulsões estáveis foram obtidas combinando óleo de girassol, mono-oleato de sorbitano e polisorbato 80 através do método de alta energia utilizando ultrassom de ponteira. A estabilidade foi avaliada por análise macroscópica, centrifugação, pH, potencial zeta, polidispersividade e condutividade elétrica. O valor de EHL requerido para o óleo de girassol foi estudado e definido igual a 7,0. Para determinar a melhor formulação, um diagrama ternário foi construído, constatando que o experimento de número 29 (80% de água, 10% de tensoativo e 10% de óleo) apresentou maior estabilidade. Ensaio primários de emulsões contendo diferentes concentrações de colágeno (0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75% e 1%) foram realizados. Formulações contendo 0,1% e 0,5% obtiveram ótima estabilidade macroscópica mesmo após a centrifugação, porém o tamanho de gota apresentou valores de 634,6 e 715,1 nm, respectivamente. Várias outras emulsões foram formuladas até chegar a emulsão F'1, na qual foi adicionada de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*. Nesta emulsão, além dos testes de estabilidade, foi realizado a atividade citotóxica frente a linhas tumorais de cólon do útero, próstata, leucemia e astrocitoma. Estes estudos de atividade in vitro, mostraram atividade, porém torna-se necessário rever os testes com concentrações maiores, visando melhorar sua ação citotóxica.

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*; *Oreochromis niloticus*; colágeno.

ABSTRACT

Emulsions are systems composed of two immiscible liquids, thermodynamically unstable and with a particle diameter greater than 200 nm. Due to the pleasant sensory properties, low irritability, optimum moisturizing, spreadability, in addition to rapid penetration of skin images, they have attention of the various areas of study. Therefore, this work presents collagen emulsions extracted from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing residues for the incorporation of aqueous extracts of dry leaves the *Phyllanthus niruri*. Collagen was extracted from the demineralized Tilapia scales by the enzyme method and by the aqueous extract of *Phyllanthus niruri*, being used as an aqueous extractor of pressurized solvent (ASE). Stable emulsions with the combination of olive oil, sorbitan monooleate and polysorbate 80 by the high energy method using tip ultrasound. The stability was analysed by macroscopic, centrifugation, pH, zeta potential, polydispersity and electrical conductivity. The EHL value required for sunflower oil is studied and recorded equal to 7.0. To determine the best formulation, a ternary diagram was constructed, noting that the experimente 29 (80% water, 10% surfactant and 10% oil), showed greater stability. Primary testes the emulsion containing collagen (0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1%) were done. The emulsions containing 0.1% and 0.5% obtained the highest macroscopic stability, even after centrifugation, but the size was 634.6 and 715.1 nm, respectively. Several other emulsions were formulated until arrive an F'1 emulsion, added to the aqueous *Phyllanthus* extract. In this emulsion, in addition to the stability tests, cytotoxic activity was carried out against tumor lines of the uterine colon, prostate, leukemia and astrocytoma. This in vitro activity studies, showed activity, however, it is necessary to review tests with higher concentrations, aiming to improve their cytotoxic action.

Keywords: *Phyllanthus niruri*; *Oreochromis niloticus*; collagen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Tilápia: produção e resíduos	13
2.2	Colágeno: estrutura e aplicação	15
2.3	Gênero <i>Phyllanthus</i>	18
2.3.1	<i>Phyllanthus niruri</i>	18
2.4	Emulsão	21
2.3.1	<i>Emulsões e suas aplicações</i>	24
2.5	Pele	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivo Específico	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Matéria-prima	27
4.2	Métodos	27
4.2.1	<i>Pré-tratamento da pele da Tilápia do Nilo</i>	27
4.2.2	<i>Caracterização de escamas de Tilápia do Nilo</i>	27
4.2.3	<i>Extração via enzimática do colágeno das escamas de Tilápia do Nilo</i>	28
4.2.4	<i>Caracterização do colágeno extraído por via enzimática</i>	28
4.2.4.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	29
4.2.4.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	29
4.2.4.3	<i>Espectroscopia de Absorção de UV-VIS</i>	29
4.2.4.4	<i>Ponto Isoelétrico</i>	29
4.2.4.5	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	29
4.2.5	<i>Cálculo do rendimento da extração de colágeno</i>	30
4.2.6	<i>Obtenção do extrato aquoso das folhas de quebra-pedra</i>	30
4.2.7	<i>Caracterização do extrato aquoso das folhas de quebra-pedra</i>	30
4.2.7.1	<i>Cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MSE)</i>	31
4.2.7.2	<i>Ensaio do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	32

4.2.7.3	<i>Ensaio do radical livre 2,2´ - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+)</i>	32
4.2.8	<i>Elaboração das emulsões</i>	33
4.2.8.1	<i>Emulsificação por método de alta energia utilizando ultrassom de ponteira</i>	33
4.2.8.2	<i>Emulsificação do colágeno por método de alta energia utilizando ultrassom de ponteira</i>	33
4.2.8.3	<i>Determinação do EHL requerido para o óleo de girassol</i>	33
4.2.8.4	<i>Diagrama Ternário</i>	35
4.2.8.5	<i>Pseudodiagrama de fases</i>	36
4.2.9	<i>Elaboração das emulsões a base de colágeno</i>	37
4.2.10	<i>Estabilidade das nanoemulsões</i>	38
4.2.10.1	<i>Estabilidade intrínseca</i>	39
4.2.10.2	<i>Análise Macroscópica</i>	39
4.2.10.3	<i>Teste de Centrifugação</i>	39
4.2.10.4	<i>Determinação do pH</i>	39
4.2.10.5	<i>Determinação da condutividade elétrica</i>	39
4.2.10.6	<i>Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta</i>	39
4.2.10.6	<i>Estresse Térmico</i>	40
4.2.11	<i>Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - Teste de MTT</i>	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Caracterização de escamas de Tilápia do Nilo	41
5.2	Caracterização do colágeno extraído por via enzimática	41
5.2.1	<i>Cálculo do rendimento</i>	41
5.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	42
5.2.3	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	42
5.2.4	<i>Espectroscopia de Absorção de UV-VIS</i>	44
5.2.5	<i>Ponto Isoelétrico</i>	45
5.2.6	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	46
5.3	Caracterização do extrato aquoso das folhas de quebra-pedra	47
5.3.1	<i>Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa</i>	48
5.3.2	<i>Avaliação da atividade antioxidante pelo métodos DPPH e ABTS</i>	50
5.4	Desenvolvimento das emulsões	51

5.4.1	<i>Determinação do EHL requerido para o óleo de girassol</i>	51
5.4.2	<i>Diagrama Ternário</i>	51
5.4.3	<i>Pseudodiagrama de fases</i>	52
5.5	Caracterização das emulsões	54
5.5.1	<i>Caracterização das emulsões a base de colágeno</i>	55
5.5.2	<i>Caracterização das emulsões a base de colágeno adicionadas do princípio ativo: extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i></i>	61
5.5.3	<i>Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - Teste de MTT</i>	68
5.5.4	<i>Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS</i>	70
6	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – COMPOSTOS DETERMINADOS POR UPLC-QTOF-MS / MS NO EXTRATO AQUOSO DE <i>Phyllanthus niruri</i>	80

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos são produzidos em todos os estágios da vida humana, variando em função das práticas de consumo e dos métodos de produção tanto em termos de composição como de volume (NOGUEIRA; CAPAZ, 2012). Como exemplo de resíduos sólidos da agroindústria, têm-se os provindos do processamento do pescado, tais como as escamas, carcaça, pele e vísceras. Estes resíduos podem representar 8 a 16% no caso de pescado eviscerado e de 60 a 72% no caso da produção de filé sem pele (KUBITZA; CAMPOS, 2018). Em nível mundial, a produção da pesca de captura foi de 93,4 milhões de toneladas no ano de 2014 (FAO, 2016), sendo assim, aproximadamente 67 milhões de toneladas de resíduos foram gerados para produzir filé de peixe.

Visando agregar valor a estes rejeitos, a extração de substâncias que compõem esses subprodutos tem-se mostrado promissora. O colágeno pode ser extraído da pele e das escamas de peixe por via ácida, salina ou enzimática. Esta proteína possui diversas utilidades na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e por isso estudos para a otimização da sua extração tem chamado atenção da comunidade científica (SILVA e PENNA, 2012).

Produtos emulsionados são bastante empregados na indústria cosmética e farmacêutica devido à veiculação de princípios ativos tanto lipofílico como hidrofílico na mesma formulação e a facilidade da aplicação destes produtos de uso tópico (MADAAN et al., 2014). Apresentam como vantagens a solubilização de drogas hidrofóbicas ou solúveis em óleo, melhoram a absorção tópica de drogas e mascaram o sabor e o odor desagradáveis das drogas (KALE e DEORE, 2016).

Como princípios ativos nestas emulsões, substâncias de origem vegetal apresentam grande aceitação do público consumidor além de diversas propriedades terapêuticas. Como exemplo, a planta *Phyllanthus niruri*, popularmente conhecida como Quebra-pedra, que apresentou em estudos, atividade hipolipidêmica (KHANNA, RIZVI E CHANDER, 2002), antiviral (WANG, CHENG, LI, MENG E MALIK, 1994), antioxidante (HARISH; SHIVANANDAPPA, 2006), anticâncer (LEE et al., 2016). São responsáveis por essas propriedades várias moléculas bioativas, como lignanas, filantina, hipofilantina, flavonóides, glicosídeos e taninos, que demonstraram estarem presentes nos extratos de *P. niruri* (PATEL et al., 2011).

No presente trabalho, resíduos de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram usados como fonte de matéria-prima para obtenção de colágeno por via

enzimática como possibilidade de uso em emulsões com bioativo de extrato aquoso de Quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) para potencial aplicação tópica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tilápia: produção e resíduos

A produção da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi observada desde a era do antigo Egito, como descrito em uma tumba egípcia que remonta a mais de 4000 anos, que mostrou os peixes mantidos em lagoas ornamentais. Embora a distribuição mundial significativa de tilápias, principalmente *Oreochromis mossambicus*, tenha ocorrido durante as décadas de 1940 e 1950, a distribuição da tilápia do Nilo começou a ocorrer mais intensamente durante a década de 1960 até a década de 1980 (FAO, 2018).

Originária das bacias do Rio Nilo, Níger, Chade e dos lagos do centro-oeste africano, pertence à ordem dos Perciformes e à família Cichlidae (VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014), é uma espécie de pequeno a médio porte, caracterizada pela coloração geral cinza prateado no dorso e branca no ventre, com riscos escuros verticais ao longo do corpo e nas nadadeiras, como observado na Figura 1 (UFRJ, 2018).

Figura 1- Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



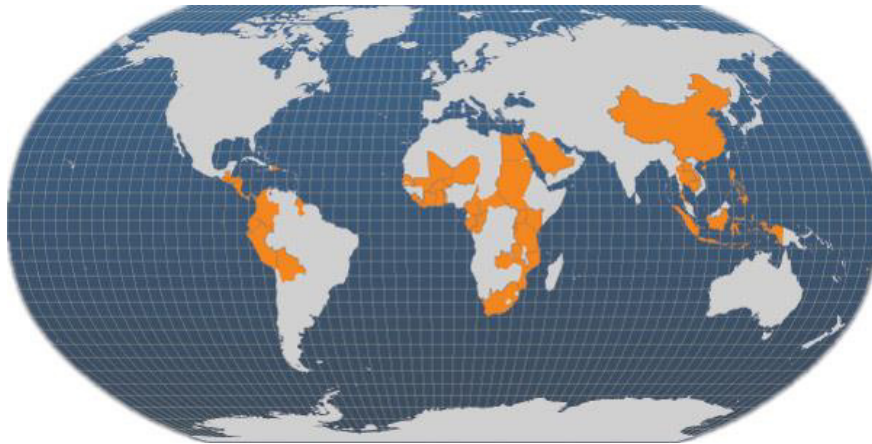
Fonte: FAO (2013).

Apresenta características importantes para a aquicultura pois pode habitar regiões tropicais e subtropicais, em águas com temperaturas variando em uma escala máxima de 8-42 ° C e em médias de 135-33 ° C. Pode sobreviver também em habitats de água salgada, porém é encontrado em grande variedade de locais de água doce (FISHBASE, 2018).

Esta espécie não apresenta espinhos em forma de “Y”, o que torna o filé de tilápia apropriado para a indústria. A sua carne possui ótima qualidade, favorecendo a aceitação pelo mercado consumidor. Portanto, estas qualidades associadas ao fato da tilápia aceitar facilmente dietas artificiais e sua excelente adaptação à diferentes habitats, fazem com que esta espécie apresente grande potencial aquícola (OLIVEIRA, 2016).

Atualmente é o peixe mais cultivado no Brasil e o quarto no mundo segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2016). Na Figura 2, observa-se os países mais importantes na produção de Tilápia do Nilo.

Figura 2-Principais países produtores de Tilápia

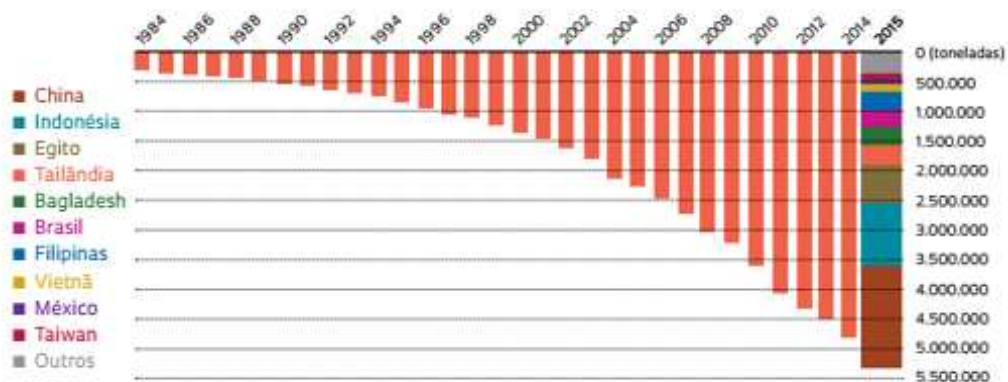


Fonte: FAO (2006).

Na Figura 3, observa-se o crescimento da produção de pescado no mundo de 1984 até 2015, tendo a China como líder do ranking com uma produção de mais de 5 milhões de toneladas, seguida da Indonésia com 3,5 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o sexto lugar, com uma produção de 1 milhão de toneladas.

Em 2015, 219.000 toneladas foram abatidas e vendidas, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Este número aumentou 9,7% em comparação a 2014 e quase 10 vezes desde 1998, quando 30.000 toneladas foram vendidas (OLIVEIRA, 2016).

Figura 3- Produção de Tilápia no mundo



Fonte: Global Aquaculture Alliance e Embrapa (2016).

Sendo assim, uma enorme quantidade de produção de Tilápia e seu consumo, resulta na produção também de uma grande quantidade de resíduo.

Os resíduos da indústria de peixe apresentam uma composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos, o que gera preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes da disposição deste material diretamente no ambiente ou oferecido in natura aos peixes cultivados (FELTES *et al.*, 2010).

Culturalmente, o resíduo é mal aproveitado e, portanto, não valorizado. O descarte indiscriminado do resíduo no solo pode causar poluição do ar, poluição das águas superficiais, além de poluição do solo e águas subterrâneas (OETTERER; BORGHESI; FERRAZ, 2018).

Diante desta produção em larga escala tanto de países desenvolvidos como subdesenvolvidos, todos enfrentam a questão de como promover o aproveitamento integral do pescado cultivado, uma vez que o aproveitamento ou não dos subprodutos e resíduos do processamento traz importantes consequências econômicas e ambientais (NOGUEIRA; CAPAZ, 2012).

O ideal seria a utilização da matéria- prima, em toda a sua escala, evitando-se a própria formação do resíduo; ou então, havendo resíduo, este deve ser minimizado ou transformado em coprodutos (OETTERER; BORGHESI; FERRAZ, 2018).

Sendo assim, diversas possibilidades de transformação foram desenvolvidas como produção de farinha, embutidos, empanados, carne mecanicamente separada, couro entre outros. A escolha dos processos de reaproveitamento a serem adotados deve levar em consideração as particularidades de cada empreendimento, as perspectivas regionais e, acima de tudo, a viabilidade econômica dos processos, que deve ser determinada através de um estudo criterioso do investimento necessário e do retorno que os mesmos proporcionarão ao empreendimento (KUBITZA; CAMPOS, 2018).

Todavia, novas pesquisas têm sido propostas para extrair desses subprodutos matérias de alto valor agregado como colágeno, gelatina, hidroxiapatita, ácido hialurônico e outros, transformando esses resíduos em matéria-prima, e conferindo um alto valor de retorno a esses produtos resultantes da extração.

2.2 Colágeno: estrutura e aplicação

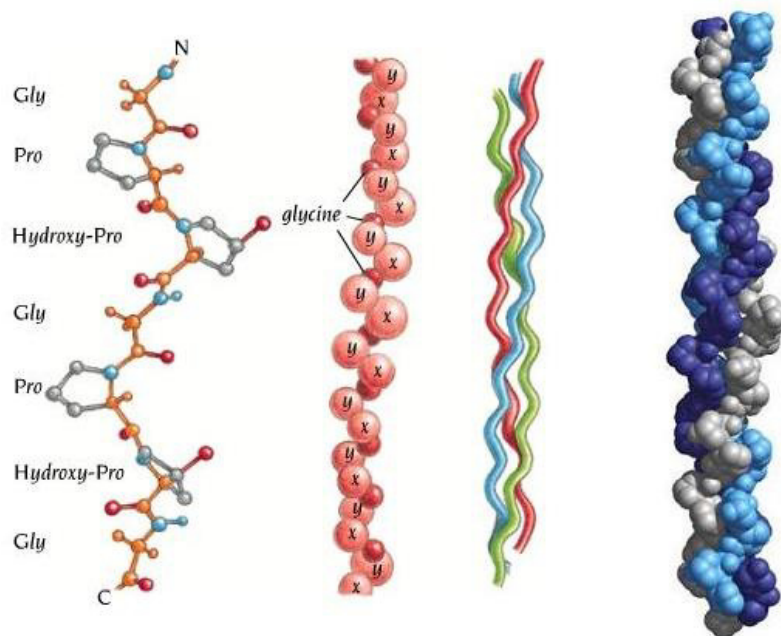
O colágeno é a principal proteína estrutural do tecido conjuntivo dos vertebrados, constituindo cerca de 30% da proteína total animal (CHUAYCHAN; BENJAKUL;

KISHIMURA, 2015). É encontrada principalmente em tecidos fibrosos, como pele, ligamento e tendão na forma de fibrilas alongadas e também é abundante na córnea, vasos sanguíneos, osso e cartilagem (BHAGWAT; DANDGE, 2018).

A molécula de colágeno é formada por três cadeias polipeptídicas, denominadas de cadeias α , que se arranjam em uma conformação de tripla hélice estabilizadas por pontes de hidrogênio intercadeias, conferindo ao colágeno características como rigidez, forma de bastão e alta estabilidade (ATAYDE, 2011).

O arranjo singular de aminoácidos leva à formação da estrutura helicoidal tripla do colágeno. A glicina é repetida a cada terceiro local na ordem, permitindo o fechamento das cadeias em forma de hélice. Na unidade repetitiva de Gly-X-Y, cerca de 35% das posições não glicínicas são envolvidas por prolina que é quase exclusivamente encontrada na posição X enquanto que as posições Y são predominantemente ocupadas por hidroxiprolina, como observado na Figura 4 (BHAGWAT; DANDGE, 2018). As cadeias α possuem ainda em suas terminações uma sequência de 15 a 20 aminoácidos denominados telopeptídeos, que é a extensão não colagenosa da molécula (ATAYDE, 2011).

Figura 4 - Estrutura do colágeno



Fonte: ISIC (2017).

O processo de síntese do colágeno ocorre principalmente durante o preparo da regeneração e do desenvolvimento do tecido embrionário (PENNA; SILVA, 2012). As moléculas de colágeno são secretadas pelos fibroblastos para matriz extracelular na forma de

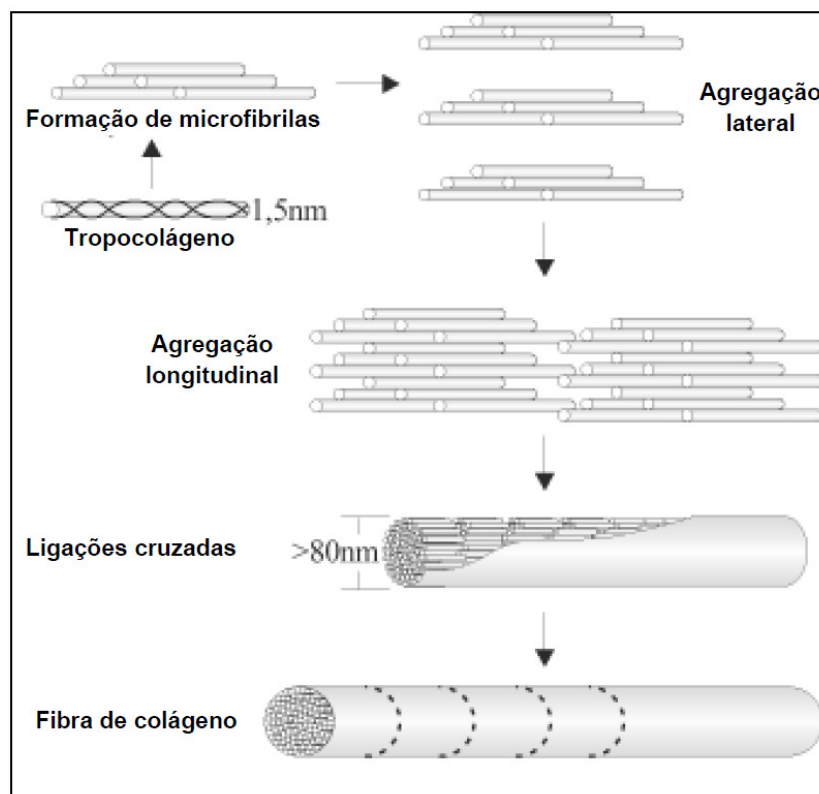
procolágeno solúvel, que possui duas estruturas globulares de peptídeos contendo nitrogênio e carbono terminais (ATAYDE, 2011).

Na matriz extracelular, ocorre a ação das C- e N-peptidases, para clivar as duas estruturas globulares ligadas às extremidades do procolágeno. A ação dessas enzimas é necessária para iniciar o processo de fibrilogênese (produção de colágeno) com a formação do tropocolágeno, que começa a se unir com outras moléculas de tropocolágeno, formando as fibrilas (PENNA; SILVA, 2012).

As moléculas de tropocolágeno unem-se na forma de conformação torça por meio de associações lado a lado, estabilizadas primeiramente pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas (PENNA; SILVA, 2012).

As fibrilas de colágeno são compostas de agregados de moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo, mas cujas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm. O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes (PENNA; SILVA, 2012). O esquema simplificado da formação das fibras de colágeno é demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema de formação da fibra de colágeno.



Fonte: Atayde (2011).

Segundo Kozłowska et al. (2015), atualmente existem 29 tipos de colágenos que se diferenciam pela sequência de aminoácidos, estrutura e função. O colágeno do tipo I é o mais comum nos vertebrados e está presente nos ossos, tendões, ligamentos e outros órgãos desempenhando a função estrutural, contribuindo para a forma e a propriedade mecânica dos tecidos.

Pode ser obtido de diversos animais (bovinos, suínos, peixes etc). No Brasil a maior parte é proveniente dos resíduos do processamento da carne, em função da elevada produção brasileira para exportação (PENNA; SILVA, 2012).

O colágeno apresenta grande biodisponibilidade e propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade e não antigenicidade, que atraem o interesse das indústrias de alimentos, cosméticos, biomateriais e farmacêuticas (KOZŁOWSKA ET AL, 2015).

O colágeno tem sido considerado um excelente biomaterial para o desenvolvimento de sistemas de curativos e construções de engenharia tecidual. Para aplicações médicas; Os colágenos são relatados para serem processados em várias formas, tais como folhas, tubos, filmes, esponjas, membranas, compósitos e dispersões (BHAGWAT; DANDGE, 2018).

2.3 Gênero *Phyllanthus*

O gênero *Phyllanthus* pertencente à família *Phyllanthaceae*, compreende cerca de 800 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A diversidade nas Américas é alta, compreendendo em torno de 200 espécies e o Brasil com importante centro de diversidade da espécie, com mais de 100 espécies distribuídas em diferentes regiões (NASCIMENTO, 2008).

Entre os representantes do gênero utilizado como planta medicinal, destaca-se a espécie conhecida como quebra-pedra, nome científico *Phyllanthus niruri*, reconhecida popularmente por suas propriedades diuréticas, utilizada bastante no tratamento de cálculos renais (NISHIURA et al., 2004).

2.3.1 *Phyllanthus niruri*

Phyllanthus niruri é uma planta herbácea encontrada em regiões tropicais e subtropicais, glabra, com até 80 cm de altura, caules simples ou ramificados, os principais

delgados e sem folhas, com ramos ou râmulos laterais filiformes, estes portando folhas como pode ser observado na Figura 6 (ANVISA, 2018).

Figura 6- *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra)



Fonte: Flora of Qatar (2014).

Existem muitas espécies comercializadas como quebra-pedra, mas não se tratam do *Phyllanthus niruri*. Uma delas é *Phyllanthus tenellus*, que apresentam características morfológicas semelhantes (SIQUEIRA, 2012).

Esta planta está presente na medicina popular brasileira e de outros países, usada comumente pela infusão de várias partes da planta no tratamento de doenças como distúrbios renais urinários, intestinais e diabetes (SIQUEIRA, 2012).

Estudos e testes clínicos comprovam que *Phyllanthus niruri* possui propriedades medicinais para as quais já vinha sendo utilizada pela medicina tradicional (BAGALKOTKAR et al., 2006; PATEL et al., 2011) e essas propriedades são referentes aos composto presentes nestes extratos como flavonóides, lignanas, alcalóides, taninos e entre outros (PATEL et al, 2011).

Muitas atividades farmacológicas da espécie *Phyllanthus niruri* foram descritas. Pucci e colaboradores (2018) comprovou que a ingestão de *P.niruri* é segura e não causa efeitos adversos significativos nos parâmetros metabólicos séricos, causando um aumento da excreção urinária de magnésio e potássio, contribuindo para a eliminação dos cálculos urinários.

Navarro e colaboradores (2017) mostraram as evidências dos potenciais efeitos dos extratos de *P. niruri* no combate a doenças relacionadas ao intestino, considerando que esses polifenóis contidos nos extratos são metabolizados pelo intestino. Outro trabalho foi

apresentado por Mediani e colaboradores (2017) foram correlacionados com atividades antioxidantes e inibidoras α -glucosidase.

Mostofa e colaboradores (2017) mostrou que as folhas possuem atividade antiinflamatória e promovem a proteção da úlcera, verificado pela regeneração da camada mucosa e prevenção substancial da formação de hemorragia e edema. Alguns dos componentes químicos da *Phyllanthus niruri* são descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Componentes químicos da *Phyllanthus niruri*

CLASSE	COMPOSTO
ALCALÓIDES	4-metoxi-norsecurinina, alosecurinina, Nirurina, norsecurinina, securinina
ESTERÓIS	β -sitosterol, estradiol
FLAVONÓIDES	astragalina, (-)-epigalocatequina, (-)-epigalocatequina-3-O-galato, eriodictiol-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, kaempferol-4'-O- α -L-ramnopiranosídeo, galocatequina, miricetrina, niruriflavona, orientina, orientina-2''-O-ramnosídeo, quercetina, quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, quercitrina, rutina, vitexina-2''-O-ramnosídeo
LIGNANAS	4-hidroxisecolintetralina, filantina, filnirurina, filtetralina, hidroxinirantina, hinoquinina, hipofilantina, isolintetralina, linantina, lintetralina, neonirtetralina, nirantina, nirfilina, nirtetralina, secoisolariciresinol trimetil eter, sesamin-4-ol
TANINOS HIDROLISÁVEIS	ácido repandusínico A, β -glicogalina, corilagina, filantusiina D, geraniina, Isocorilagina
TERPENOS	filantenol, filantenona, filanteol, limoneno, lupeol, p-cimeno
OUTROS	1-O-galoil-6-O-luteoil- α -D-glucopiranosídeo, ácido carboxílico da brevifolina, ácido elágico, ácido gálico, brevifolina, filangina, nirurisídeo, metil- brevifolinacarboxilato

Fonte: Adaptado de Souza (2017).

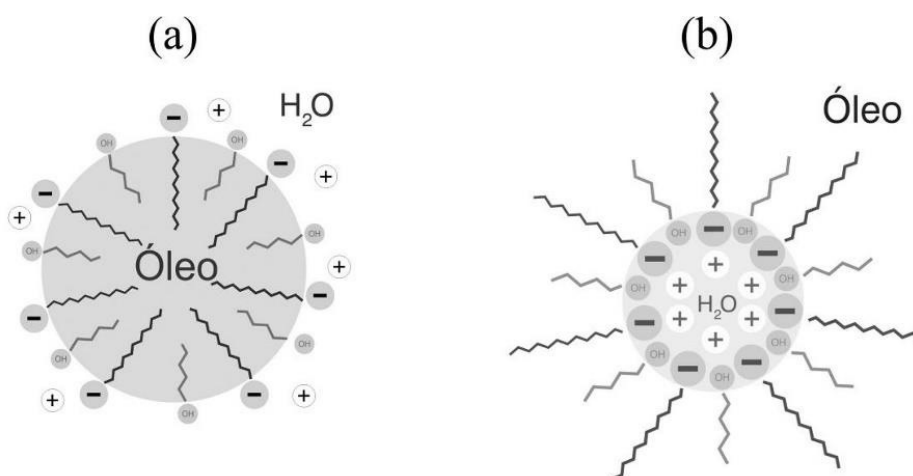
Devido à vasta aplicabilidade desta planta, estudos continuam sendo feitos para produzir fármacos e cosméticos que contenham esses ativos responsáveis por funções terapêuticas.

2.4 Emulsão

Emulsões são sistemas coloidais formados por uma fase líquida dispersa em outra fase líquida imiscível, como exemplo água e óleo, utilizando cisalhamento mecânico (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). São termodinamicamente instáveis devido à diferença nas interações entre as duas fases (tensão interfacial). Esta tensão pode ser reduzida, adicionando moléculas de caráter anfifílico a superfície, os tensoativos, que são solúveis em uma das duas fases (MASON, 2006; PEREIRA, 2015; KALE, 2016).

Este sistema apresenta uma fase contínua e outra dispersa. A diferença de fases está relacionada com a natureza do tensoativos empregado na elaboração da emulsão. Caso o surfactante seja solúvel na fase oleosa, esta será a fase contínua (fase externa) e a fase aquosa será a fase dispersa (gotas esféricas e pequenas). Um sistema denominado O/A ocorre quando a fase oleosa está dispersa na fase aquosa, e um sistema A/O ocorre quando a fase aquosa está dispersa na fase oleosa como mostrado na Figura 7 (YUKUYAMA, 2015; PEREIRA, 2015).

Figura 7 - Tipos de emulsão



Fonte: Adaptado Silva *et al.* (2015).

Segundo a teoria da tensão superficial, quando são adicionados produtos emulsionantes ou surfactantes, estes diminuem a tensão entre as superfícies dos líquidos imiscíveis, diminuindo a força repelente entre eles e reduzindo a atração das moléculas do

mesmo líquido (KALE; DEORE, 2016).

As emulsões são classificadas principalmente de acordo com o tamanho de partícula e a estabilidade termodinâmica. Todavia, outras características são analisadas como exemplo, quantidade de fases, viscosidade, modo de preparação, tensão interfacial e etc.

Sendo assim, podem ser categorizadas em emulsões, microemulsões e nanoemulsões (KOMAIKO; MCCLEMENT, 2016). Na Tabela 2, têm-se a classificação de emulsões e suas características.

Tabela 2 - Tipos de emulsões.

Tipo de emulsão	Tamanho de partícula	Estabilidade
Emulsão	> 200 nm	Instável
Nanoemulsão	< 200 nm	Instável
Microemulsão	< 100 nm	Estável

Fonte: Adaptado Komaiko e Mcclement (2016).

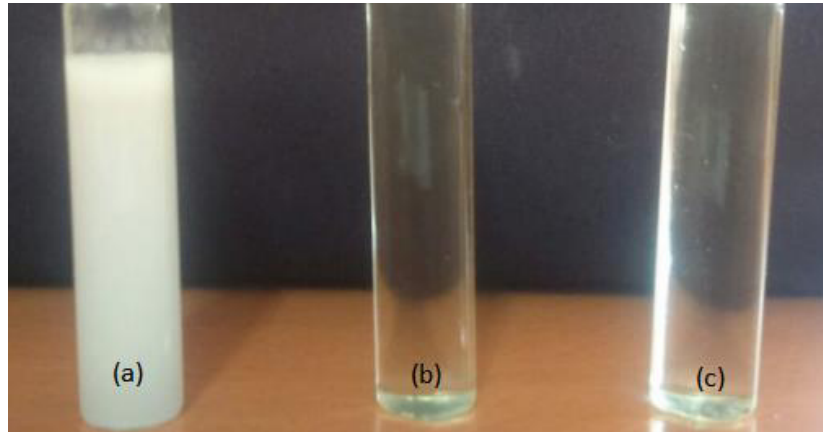
As emulsões convencionais são dispersões de dois líquidos imiscíveis, formado por cisalhamento mecânico e surfactantes. Escolha do surfactante é realizada com base no balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). Surfactantes com valores baixos de HLB são utilizados para formar a emulsão A/O e os de alto valor de HLB são usados para formar emulsões O/A (KALE; DEORE, 2016).

Microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis, transparentes e de baixa viscosidade, formado por partículas de tamanho nanométrico com diâmetro aproximadamente de 1 a 100 nm, geralmente de 10 a 50 nm, dispersas em uma fase contínua de um solvente imiscível com a fase dispersa (SILVA et al, 2015).

Nanoemulsões são muito semelhantes às microemulsões que são dispersões de escala nanométrica, mas obtidas por força mecânica, ao contrário de microemulsões, que se formam espontaneamente, é necessário fornecer energia ao sistema para que sejam formadas e são cineticamente estáveis em grande escala de tempo (MCCLEMENTS, 2012; GUPTA et al, 2016; (KALE; DEORE, 2016).

Na Figura 8, observamos a aparência dos três tipos de emulsões, emulsão convencional, microemulsão e nanoemulsão. As emulsões convencionais possuem um aspecto leitoso, devido ao tamanho de partícula não ser tão baixo, diferente das microemulsões e nanoemulsões que são de escala nanométrica e por isso são opticamente transparentes ou translúcidas.

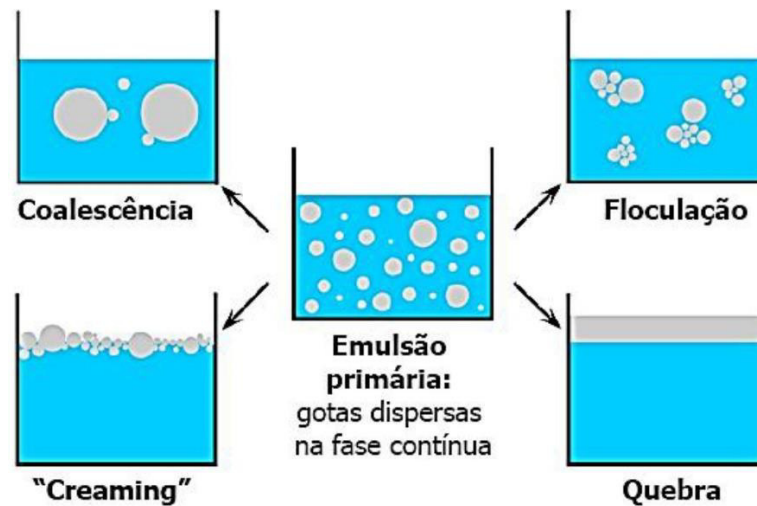
Figura 8 - Emulsão (a), microemulsão (b) e nanoemulsão (c)



Fonte: Adaptado Kale e Deore (2016).

Provavelmente, a consideração mais importante em relação as emulsões farmacêuticas e cosméticas é a estabilidade do produto. A estabilidade de uma emulsão farmacêutica caracteriza-se pela ausência de coalescência de fase, ausência de creaming e manutenção da aparência, odor, cor e outros propriedades (Figura 9) (MADAAN *et al*, 2014).

Figura 9 – Fatores de instabilidade de emulsões.



Fonte: Madaan *et al* (2014).

Creaming pode ser definido como o movimento ascendente dos glóbulos dispersos para formar uma camada espessa na superfície da emulsão. As colisões entre gotas podem resultar em floculação, que pode levar à coalescência em glóbulos maiores. Eventualmente, a fase dispersa pode se tornar a fase contínua, separada da dispersão média por uma única interface. Neste caso, tem-se a emulsão totalmente separada (quebra) (FRANZOL e REZENDE, 2015; Silva *et al*, 2015).

2.4.1 Emulsões e suas aplicações

As emulsões têm grandes vantagens como excelente meio de solubilização de drogas hidrofóbicas ou solúveis em óleo, aumentam a absorção de drogas, melhoram a absorção tópica de drogas, mascaram o sabor e o odor desagradáveis das drogas e melhoram a palatabilidade dos óleos (KALE e DEORE, 2016).

Segundo Silva et al (2015), devido estas características, elas são usadas em diferentes tipos de indústrias. As emulsões preparadas com componentes biocompatíveis têm sua principal aplicação nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. A utilização das emulsões na tecnologia farmacêutica é relativamente recente e tem despertado grande interesse como sistema de liberação de fármacos no organismo. Este interesse justifica-se, pela facilidade de sua preparação e por apresentarem elevadas taxas de difusão e penetração na pele.

Também são utilizadas na liberação de compostos flavorizantes e conservantes, na solubilização e estabilização de nutrientes, em sistemas antimicrobianos, em análises químicas de alimentos, em tintas e entre outras. (SILVA et al, 2015; TADROS, 2009)

A utilização acima descrita de emulsões em processos industriais justifica também a vasta quantidade de pesquisa básicas que são realizadas com o objetivo de compreender as origens da instabilidade de emulsões e desenvolvimento de métodos para evitar sua quebra e seus efeitos de instabilidade em curto e, principalmente, longo prazo.

Sendo assim, utilizar produto emulsificado adicionado em sua formulação com compostos ativos, neste caso, extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, pode ter melhor resultado devido a melhor dispersão e transporte através da pele desses ativos.

2.5 Pele

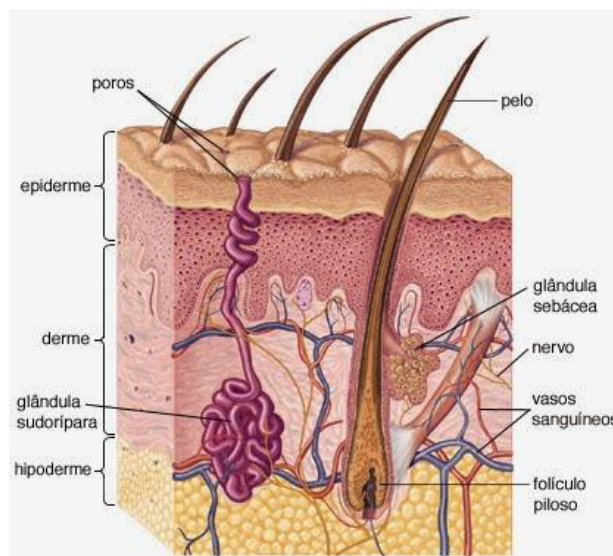
A pele é o maior órgão do corpo humano e a principal barreira física contra o meio externo. Desempenha funções protetoras, metabólicas, sensoriais e imunológicas e para tal, a pele deve manter sua própria capacidade de auto-reparação e integridade funcional (MICHALUN, 2010).

A pele consiste em uma barreira eficiente, porém pode ser penetrada por substâncias pequenas, no caso de moléculas hidrofílicas ocorre difusão profunda na pele e no caso de moléculas lipofílicas pelo estrato córneo (SOUZA, 2003).

É formada por um conjunto de tecidos complexos e especializados. As principais

camadas da pele são a epiderme, derme e a hipoderme representadas na Figura 10.

Figura 10 – Estrutura da Pele.



Fonte: Adaptado Enciclopédia Britânica (2010).

A pele consiste em uma barreira eficiente, porém pode ser penetrada por substâncias pequenas, no caso de moléculas hidrofílicas ocorre difusão profunda na pele e no caso de moléculas lipofílicas pelo estrato córneo (SOUZA, 2003).

Denomina-se penetração cutânea quando o ativo passa somente pelo estrato córneo, e permeação cutânea quando o ativo atravessa a epiderme e atinge a derme, ou seja, as vias transdérmicas (LEONARDI, 2008).

Existem três mecanismos primários de absorção tópica de fármacos: Transcelular (através dos corneócitos e da bicamada lipídica), Intracelular (através da solubilização na bicamada lipídica extracelular) e Folicular (através dos folículos pilosos ou glândulas sudoríparas) (BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011).

Diversos produtos tópicos já são usados há anos para administrar medicação para dor e combate a infecção para um local afetado do corpo. Novas tecnologias agora permitem que outros tipos medicamentos sejam absorvidos pela pele. Estes podem ser usados para tratar não apenas as áreas afetadas (por exemplo, a pele), mas todo o corpo. (SHAIK *et al*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produção de emulsões de colágeno obtidas através de resíduos do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e do extrato de Quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), visando potencial utilização como antioxidante/anticâncer para uso tópico.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar as escamas utilizadas como matérias-primas para a extração do colágeno;

Extrair o colágeno presente nas escamas da tilápia por via enzimática;

Caracterizar o colágeno obtido através de análises morfológicas, estruturais, térmicas e de estabilidade;

Extrair o extrato aquoso das folhas secas de *Phyllanthus niruri*;

Caracterizar o extrato aquoso por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;

Avaliar a atividade antioxidante pelo método de ensaio do DPPH e ABTS do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*;

Desenvolver emulsão a base de colágeno tendo como ativo extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*;

Caracterizar a emulsão obtida através de análises organolépticas, físicas e funcionais;

Verificar o potencial citotóxico *in vitro* de extrato, substância pura e formulações em linhagens de células tumorais e não tumoral;

Determinar a atividade antioxidante na emulsão com extrato de quebra-pedra pelo método ABTS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

A pele de tilápia foi fornecida pela empresa Valpex, em Fortaleza, Ceará. As folhas secas e trituradas de *Phyllanthus niruri* foram fornecidas pelo Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN), situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma purificação adicional e como recebidos do fornecedor. Projeto envolvido de número A3B1887 PC Tecnologia do Pescado.

4.2 Métodos

4.2.1 Pré-tratamento da pele de Tilápia do Nilo

As peles de tilápia foram colocadas em liquidificador industrial e trituradas para separar as escamas da pele. Posteriormente, as escamas foram lavadas diversas vezes com água de torneira e destilada, com posterior secagem ao sol. Após essa etapa, o material foi moído em moinho criogênico. Em seguida, 500 g de escamas moídas foram postas em reator sob agitação constante, a 4 ° C, durante 24 horas juntamente com solução de NaOH 0,1 M para retirada das proteínas não-colagenosas. Decorrido o tempo, as escamas foram filtradas e lavadas até pH neutro. Para desmineralizar as escamas, foi necessário colocá-las em reator sob agitação constante, a 4 °C, durante 48 horas, juntamente com uma solução de EDTA 0,2 M (pH 7,4). Após ter transcorrido o tempo, as escamas foram filtradas e lavadas até pH neutro. Posteriormente, foi realizado o processo de extração por via enzimática.

4.2.2 Caracterização de escamas de Tilápia do Nilo

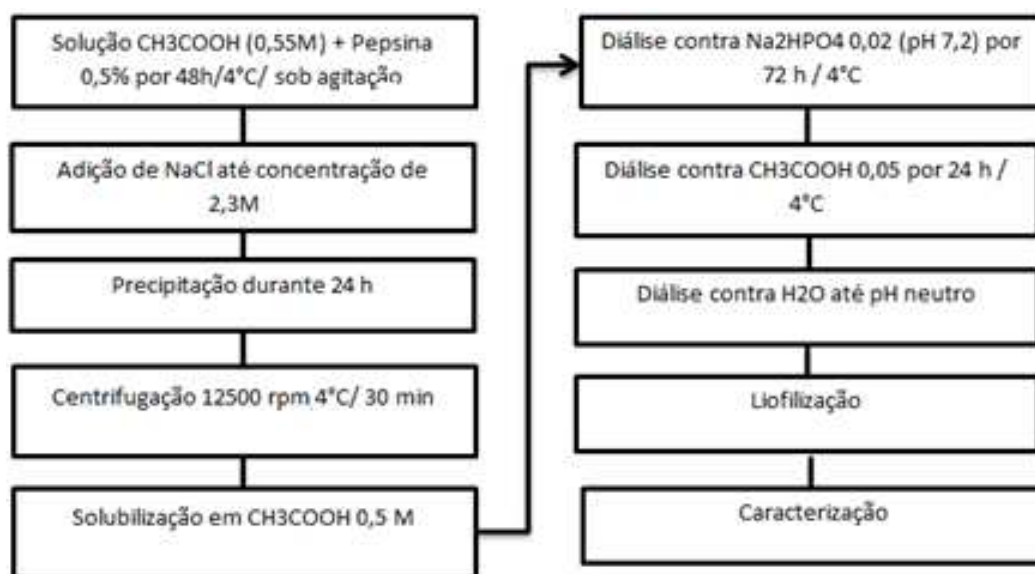
As escamas foram caracterizadas visando determinar o teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas. O teor de umidade foi determinado em balança de infravermelho modelo MARTE ID50. Teores de cinzas foram determinados por método gravimétrico, teores de lipídeos foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet e de proteínas foram inferidos pelo método de Kjeldahl de determinação de nitrogênio, com fator de conversão de

6,25 (AOAC, 1995).

4.2.3 Extração via enzimática do colágeno das escamas de Tilápia do Nilo

As escamas desmineralizadas foram colocadas no reator juntamente com CH_3COOH 0,55 M e pepsina 0,5% (m/m) sob agitação, temperatura de 4 °C durante 48 horas. Após o processo de extração, o colágeno foi precipitado utilizando NaCl até concentração de 2,3 M e o sistema foi deixado em repouso durante 24 horas a 4° C. A mistura foi centrifugada em rotação de 12500 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado e o colágeno foi solubilizado em CH_3COOH 0,5 M e colocado na diálise em Na_2HPO_4 0,02 (pH 7,2) por 72 horas, depois CH_3COOH 0,05 M por 24 horas e por fim em água destilada até pH neutro. Decorrido o processo de diálise, o material foi colocado para liofilizar, moído, pesado e caracterizado (Figura 11).

Figura 11 – Extração via enzimática



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Caracterização do colágeno extraído por via enzimática

O colágeno extraído foi caracterizado através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Absorção UV-VIS, Potencial Zeta e ponto isoelétrico e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

4.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada no laboratório de Microscopia, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

Foi utilizada uma metalizadora Emitech, para o recobrimento com platina, formando uma camada com 60 nm de espessura, e Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 940A, sob uma voltagem de aceleração de 15 kV.

4.2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), em Fortaleza, CE. Foi utilizado o equipamento modelo Perkin Elmer IR SPECTRUM ASCII PEDS 1.60, com pastilhas de KBr.

4.2.4.3 Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A análise de absorção UV-VIS foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. O colágeno foi dissolvido em solução de ácido acético 0,5 mol.L⁻¹ até uma concentração final de 1mg/mL. Foi feito uma linha de base com solução de ácido acético 0,5 mol.L⁻¹. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-2450 (SHIMADZU), no intervalo de comprimento de onda de 190 – 550 nm.

4.2.4.4 Ponto Isoelétrico

A análise de potencial zeta foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

O colágeno foi solubilizado em ácido acético 0,5 mol. L⁻¹ em uma concentração de 1 mg/ml. A solução foi agitada à temperatura de 4°C por 24 horas. Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula com potencial zeta modelo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), operando na temperatura de 25°C. Utilizou-se ácido nítrico 1M e hidróxido de potássio 1M em uma faixa de pH de 2,4 a 12,0, com leituras a cada mudança de pH de 0,5.

4.2.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial

A análise de DSC foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. Foi utilizado um equipamento DSC Q20 V24.9 Build 121 e gás nitrogênio com vazão de 50 mL/min. O experimento foi realizado a uma taxa de 1°C/min com uma temperatura de equilíbrio de 10°C e uma temperatura final de 100°C, e a amostra foi diluída em ácido acético 0,5 mol/ L em proporção 1:40.

4.2.5 Cálculo do rendimento da extração do colágeno

O rendimento da extração foi calculado pela razão entre a massa em gramas de colágeno obtido na extração e a massa de escamas desmineralizadas utilizada na extração, como mostrada na Equação 1:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{massa de colágeno (g)}}{\text{massa das escamas (g)}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.6 Obtenção do extrato aquoso das folhas de quebra-pedra

A extração foi realizada em um sistema extrator acelerado por solvente pressurizado Dionex ASE 350 (Sunnyvale, CA, USA) usando água deionizada como solvente. 5 g de folhas secas de *Phyllanthus niruri* foram misturados com 5 g de terra diatomáceas (agente dispersante) e colocado em uma célula de 66 mL de aço inoxidável. A célula foi equipada com um filtro de aço inoxidável e um filtro de celulose na parte inferior para evitar a presença de partículas no balão de coleta. A extração foi realizada a 192 ° C por 5 min em sequência de três ciclos e a pressão do sistema foi de 110 ± 7 bar. O extrato obtido foi congelado, liofilizado e pesado.

4.2.7 Caracterização do extrato aquoso da quebra-pedra

4.2.7.1 Cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS^E)

Foi seguida a metodologia de Khoza et al. (2014) com algumas modificações. Primeiramente foi utilizado um sistema UPCH da Acquity (Waters Corporation) acoplado a um sistema quadrupolo/tempo de voo (QToF) (Waters Corporation). Os compostos foram separados numa coluna Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 150 mm) operada a 40 ° C. O

sistema eluente utilizado foi uma combinação de A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) a uma taxa de fluxo de 0,4 mL / min. O gradiente variou linearmente de 2 a 95% de B (v / v) ao longo de 15 min, mantido à 100% de B no intervalo de 15,1 – 17,1 min e uma lavagem final e reequilíbrio de 2% de B no intervalo de 17,1 – 19,1 min. O volume de injeção da amostra foi de 5 µL.

Os espectros de massa foram registrados em modo de ionização por eletrospray de polaridade negativa (ESI) numa gama de massas entre 110 e 1180 Da, tempo de varredura de 0,1 seg, com encefalina leucina como massa de bloqueio padrão.

As configurações do instrumento foram as seguintes para o modo ESI: energia de colisão de 5eV, tensão capilar de 2,6 kV, tensão do cone de amostra de 20 V, tensão do cone de extração de 0,5 V, temperatura da fonte de 120 ° C, temperatura de dessolvatação a 350 ° C e fluxo de gás de dessolvatação a 500 L / h.

As amostras foram dissolvidas em água a uma concentração de 2,5 mg / mL e filtradas sobre membranas de PTFE de 0,22 µm.

Os cromatogramas foram elucidados no MassLynx Mass Spectrometry Software (Water Corporation).

4.2.7.2 Ensaio do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante do extrato foi determinada pelo ensaio do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), segunda a metodologia descrita por Hatano, Kagawa, Yasuhara e Okuda (1988), com algumas modificações. Inicialmente, foi diluído o extrato liofilizado em água até uma concentração de 10mg / mL. Em seguida, o extrato (10-100 µg) foi adicionado a uma solução de 0,5 ml de DPPH (0,25 mM em etanol a 95%). A mistura foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min e a absorbância foi medida a 517 nm num espectrofotômetro. Foi preparado também o branco, realizando o mesmo procedimento, mas substituindo o extrato por água. Os experimentos foram realizados em triplicata. Assim, foi então determinado a percentagem de inibição (PI), que consiste na quantidade de radical livre DPPH captado pelas espécies antioxidantes, sendo que a PI é diretamente proporcional à concentração de antioxidantes presentes no extrato, utilizando a equação 2.

$$PI(\%) = \frac{Abs_0 - Abs_t}{Abs_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde Abs_0 corresponde à absorvância do branco no tempo zero e Abs_t equivale à absorvância da amostra após 30 minutos de reação. Um estudo de cinética da atividade antioxidante também foi realizado, além de seu EC50, que consiste na concentração do extrato necessária para reduzir 50% do radical DPPH. Para o cálculo do valor de EC50, foi calculada a atividade antioxidante em diferentes concentrações, após a estabilização de sua absorvância, de forma a traçar uma curva linear entre a atividade antioxidante do respectivo extrato e sua concentração. Os dados encontrados foram submetidos a uma regressão linear, obtendo assim a equação da reta para cálculo do EC₅₀.

4.2.7.3 Ensaio do radical livre 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺)

Este procedimento foi adaptado de Larrauri et al (1997). A partir do extrato, preparou-se em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio e adicionado 3,0 mL do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), cronometrando o tempo, homogeneizando em agitador de tubos. Realizou-se a leitura (734 nm) após 6 minutos da mistura. O álcool etílico foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorvâncias obtidas as diferentes diluições dos extratos, plotaram-se os dados em Software Windows Excel, a absorvância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, a equação da reta foi determinada. Para calcular a atividade antioxidante (AAT), deve-se substituir na equação da reta absorvância equivalente a 1000 µM do padrão trolox (Equação 3). O valor obtido para o termo x corresponde a diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox (Equação 4).

Determinação da curva-padrão

$$y = -ax + b \quad (3)$$

Onde:

Y = absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox.

X = 1.000 µM do trolox

$$y = -ax + b \quad (4)$$

Onde:

Y = Absorvância corresponde a 1.000 µM de trolox

X = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

A partir do resultado encontrado da Equação 4, dividir por 1.000 para ter o valor em gramas (Equação 5). O resultado final (Equação 6) é calculado pela divisão de 1.000 (μM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1 (g) para encontrar o valor final Z que é expresso em μM trolox/ g de extrato.

$$X(g) = x/1000 \quad (5)$$

$$Z = \frac{1000}{X(g)} \cdot 1 \quad (6)$$

4.2.8 Elaboração das emulsões

4.2.8.1 Emulsificação por método de alta energia utilizando ultrassom de ponteira

Aqueceu-se a fase a oleosa e aquosa separadamente a temperatura de $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a fase oleosa mantendo-se sob agitação (600 rpm) até temperatura ambiente, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Depois, a emulsão foi homogeneizada em Ultra-turrax durante 10 minutos a 8000 rpm. Após a homogeneização, as emulsões foram ultrasonificadas com ultrassom de ponteira da marca Unique durante 10 minutos com potência de 100 W.

4.2.8.2 Emulsificação do colágeno por método de alta energia utilizando ultrassom de ponteira

Verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a fase oleosa mantendo-se sob agitação (600 rpm). Depois, a emulsão foi homogeneizada em Ultra-turrax durante 10 minutos a 8000 rpm. Após a homogeneização, as emulsões foram ultrasonificadas com ultrassom de ponteira durante 10 minutos com potência de 100 W em banho de gelo.

4.2.8.3 Determinação do EHL requerido para o óleo de girassol

A seleção do EHL requerido para o óleo de girassol foi realizada com um par de tensoativos variando de 1 e 1 ponto a partir do valor de EHL 4,3 (tensoativo lipofílico/ monooleato de sorbitano/ Span 80) até o valor de EHL 15 (tensoativo hidrofílico/ polisorbato 80/ Tween 80).

A porcentagem total da mistura de tensoativos foi de 5% e 10%, sendo a do óleo de girassol fixada em 10%.

Para o cálculo das quantidades dos tensoativos necessário para cada valor de EHL foi utilizada a seguinte equação:

$$A + B = 100 \quad (7)$$

$$EHL_A \times 0,01.A + EHL_B \times 0,01.B = EHL_R \quad (8)$$

Onde:

A: porcentagem do tensoativo hidrofílico;

B: porcentagem do tensoativo lipofílico;

EHL_A: Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;

EHL_B: Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;

EHL_R: Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante ou requerido para fase oleosa.

As Tabelas 3 e 4 demonstram a composição das emulsões para determinação do EHL requerido para o óleo de girassol utilizando o par de tensoativo Tween 80 e Span 80.

Tabela 3- Concentração de tensoativos utilizados na determinação do EHL requerido para o óleo de girassol com 5% de tensoativos.

Valor de EHL	Tensoativo Lipofílico Span 80 (% p/p)	Tensoativo Hidrofílico Tween 80 (% p/p)	Formulação
4,3	5,0	-	N1
5,0	4,67	0,33	N2
6,0	4,21	0,79	N3
7,0	3,74	1,26	N4
8,0	3,27	1,73	N5
9,0	2,80	2,20	N6
10,0	2,34	2,66	N7
11,0	1,87	3,13	N8
12,0	1,40	3,60	N9
13,0	0,93	4,07	N10
14,0	0,47	4,53	N11
15,0	-	5,0	N12

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras foram submetidas à avaliação macroscópica após 24 horas, e avaliada a homogeneidade. As que não apresentaram cremeação e separação de fase foram

centrifugadas e avaliadas macroscopicamente novamente, posteriormente avaliado o tamanho de partícula.

As formulações homogêneas foram determinadas estáveis e, portanto o EHL destas foram o requerido para o óleo de girassol (GULLAPALLI; SHETH, 1999).

Tabela 4- Concentração de tensoativos utilizados na determinação do EHL requerido para o óleo de girassol com 10% de tensoativos.

Valor de EHL	Tensoativo Lipofílico Span 80 (% p/p)	Tensoativo Hidrofílico Tween 80 (% p/p)	Formulação
4,3	10,0	-	T1
5,0	9,34	0,66	T2
6,0	8,41	1,59	T3
7,0	7,47	2,53	T4
8,0	6,54	3,46	T5
9,0	5,6	4,4	T6
10,0	4,67	5,33	T7
11,0	3,73	6,27	T8
12,0	2,8	7,2	T9
13,0	1,86	8,14	T10
14,0	0,93	9,07	T11
15,0	-	10,0	T12

Fonte: Elaborada pela autora.

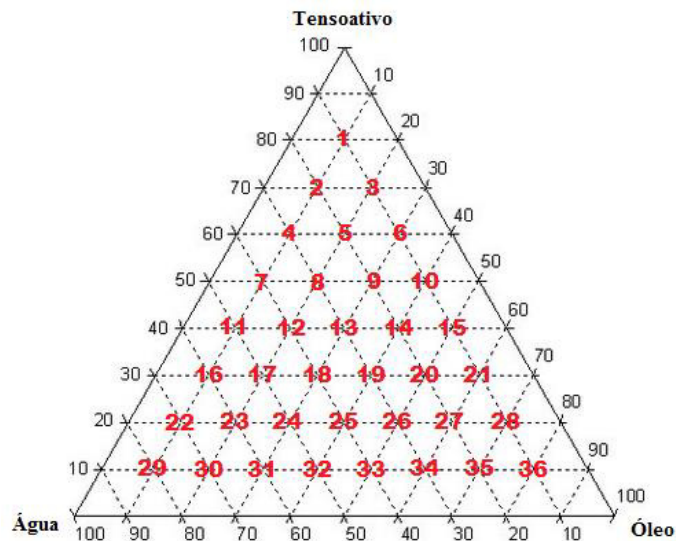
4.2.8.4 Diagrama Ternário

Para aperfeiçoar a formulação de uma emulsão é preciso utilizar um diagrama de fases para determinar a melhor relação entre óleo, tensoativos e água. De acordo com Treguier *et al.* (1975) o diagrama ternário é representado por triângulo equilátero, no qual cada vértice é um constituinte e representa 100% deste constituinte na nanoemulsão, como representado na Figura 12. Para determinar a porcentagem dos constituintes em cada ponto (1-36), traça-se uma reta paralela aos lados opostos aos vértices 100% de cada constituinte.

Os experimentos foram realizados para cada ponto de acordo com EHL requerido para o óleo de girassol que foi determinado de acordo com o item 4.2.8.3. Posteriormente, as

emulsões que apresentaram homogeneidade nos testes de estabilidade intrínseca e centrifugação foram analisadas quanto ao tamanho de partícula. A emulsão que demonstrou maior estabilidade foi determinada como ponto ótimo e utilizada como base para as posteriores formulações.

Figura 12 - Diagrama Ternário.

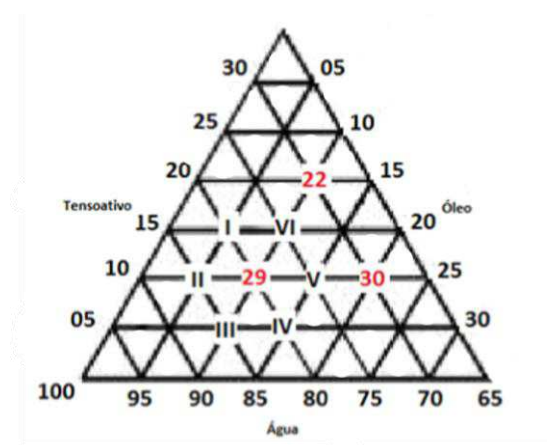


Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.8.5 Pseudodiagrama de fases

Para avaliar a região vizinha ao ponto ótimo e determinar se existiria alguma melhora nas propriedades das emulsões, foi feito um estreitamento das porcentagens dos constituintes de 5 em 5% ao redor do ponto ótimo (Figura 13).

Figura 13 - Pseudodiagrama de fases das emulsões.



Fonte: Elaborado pela autora.

As seis formulações foram preparadas e analisadas igualmente como descrito para as 36 amostras do diagrama ternário.

4.2.9 Elaboração das emulsões a base de colágeno

Após o estudo do EHL requerido para o óleo de girassol, foram feitos estudos com a adição do colágeno para analisar a estabilidade do sistema emulsionado, observando alguma quebra ou modificação na emulsão com adição da proteína. Na Tabela 5, observam-se os valores para as formulações.

Tabela 5- Formulação das emulsões com colágeno.

COMPOSIÇÃO	E1	E2	E3	E4	E5	E6
FASE OLEOSA						
Óleo de girassol	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Span 80	7,47 %	7,47 %	7,47 %	7,47 %	7,47 %	7,47 %
Tween 80	2,53%	2,53%	2,53%	2,53%	2,53%	2,53%
FASE AQUOSA						
Colágeno	0,1%	0,25%	0,5%	0,75%	1%	1,5%
Ácido cítrico	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Água q.s.q	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente, as emulsões foram submetidas a testes primários de estabilidade, realizados 24 horas após a formulação da emulsão. Para aquelas que apresentaram homogeneidade nos testes de estabilidade intrínseca e centrifugação, foram analisadas o seu tamanho de partícula e índice de polidispersividade.

As emulsões que apresentaram as melhores características quanto ao tamanho e Pdl, além de estabilidade após a adição do colágeno, sem variações macroscópicas, foram utilizadas para fazer as formulações com o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (Tabela 6). Conseqüentemente, após avaliação, foi escolhida uma formulação que apresentou melhores propriedades e estabilidade para ser a formulação completa adicionada de BHT e DMDM na qual também foram avaliadas suas propriedades (Tabela7).

Tabela 6- Formulação das emulsões com colágeno e extrato.

COMPOSIÇÃO	F1	F2	F3	F4	F5
FASE OLEOSA					
Óleo de girassol	10%	10%	10%	10%	10%
Span 80	7,47 %	7,47 %	7,47 %	7,47 %	7,47 %
Tween 80	2,53%	2,53%	2,53%	2,53%	2,53%
FASE AQUOSA					
Colágeno	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%
Ácido cítrico	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Extrato	1,3%	2,6%	3,9%	5,2%	6,5%
Água q.s.q	100%	100%	100%	100%	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7 - Formulação da emulsão F'1 com colágeno e *Phyllanthus niruri*.

COMPOSIÇÃO	F'1
FASE OLEOSA	
Óleo de girassol	10%
Span 80	7,47%
Tween 80	2,53%
FASE AQUOSA	
Colágeno	0,25%
Ácido cítrico	0,01%
BHT	0,05%
DMDM	0,03%
Extrato aquoso	1,3%
Água q.s.q	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

As emulsões foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade descritos no subitem 4.2.10.

4.2.10 Estabilidade das nanoemulsões

4.2.10.1 Estabilidade intrínseca

As emulsões foram analisadas macroscopicamente 24 horas após o preparo. Foram analisadas as características organolépticas e a homogeneidade das formulações identificando possíveis processos de instabilidade como cremeação, floculação e separação de fases.

4.2.10.2 Análise Macroscópica

Uma pequena quantidade de formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com lamínula sob ligeira pressão. A lâmina foi submetida à análise microscópica na qual foi avaliada a homogeneidade e morfologia da dispersão.

4.2.10.3 Teste de Centrifugação

Uma quantidade de 5 g de amostra de cada formulação foi colocada em tudo de vidro graduado e submetido à velocidade de 3000 rpm durante 30 minutos em uma centrífuga 80-2B em temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). Foram observados macroscopicamente conforme descrito no item 4.2.10.2.

4.2.10.4 Determinação do pH

Foi determinado à temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) inserindo o eletrodo do phmetro da Hanna Instruments diretamente na amostra. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.10.5 Determinação da condutividade elétrica

Foi determinado à temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) utilizando condutivímetro DM-32 da Digimed inserindo o eletrodo diretamente na amostra. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.10.6 Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta

A análise de Potencial Zeta e tamanho de partícula foi realizada no laboratório de Tecnologia da Biomassa, situado na Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula com potencial zeta modelo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), operando na temperatura de 25°C.

4.2.10.7 Estresse Térmico

Amostras de 5 g das formulações foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho termostaticado na faixa de temperatura de 40 °C ± 2 °C a 80 °C ± 2 °C. A cada 30 minutos a temperatura foi elevada em 5 °C. A cada aumento de temperatura e ao final do aquecimento as amostras foram analisadas macroscopicamente.

4.2.11 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - teste do MTT

As células foram plaqueadas nas concentrações de $0,7 \times 10^5$, $0,1 \times 10^6$ céls/mL para as linhagens HCT-116 e L929, SNB/PC3, respectivamente. As placas foram incubadas com a substância por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

As linhagens tumorais utilizadas, SNB-19 (Astrocitoma-Cérebro Humano), PC3 (Próstata), HCT-116 (Cólon do útero) e L929 (Fibroblasto murinho), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 e DMEM (L929), suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram testadas nas concentrações 100 µg/mL para o extrato e emulsão e os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média ± desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Os valores correspondentes à umidade, cinzas, proteínas e lipídeos obtidos nas análises estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Porcentagens de componentes nas escamas

Componentes	Teor nas escamas (%)
Umidade	12,67
Cinzas	27,37
Lipídeos	0,62
Proteínas	53,00

Fonte: Elaborado pela autora.

O teor de umidade encontrado é próximo do valor de 14,06% encontrado por Martins et al (2015), para as escamas de Tilápia do Nilo. O alto valor de cinzas é referente ao cálcio, magnésio e potássio que compõem a hidroxiapatita, composto presente nas escamas, sendo necessário o processo de desmineralização para retirar todos os materiais presentes nas escamas. O baixo valor de lipídeos em escamas é um fator importante na extração de colágeno, pois a etapa de desengorduramento não é necessária, diferente do que ocorre na pele do peixe que possui teor de lipídeos elevado. A quantidade de proteína superior à metade da composição das escamas também corresponde ao valor encontrado por Martins et al (2015), que foi de 58%.

5.2 Caracterização do colágeno extraído por via enzimática

5.2.1 Cálculo do rendimento

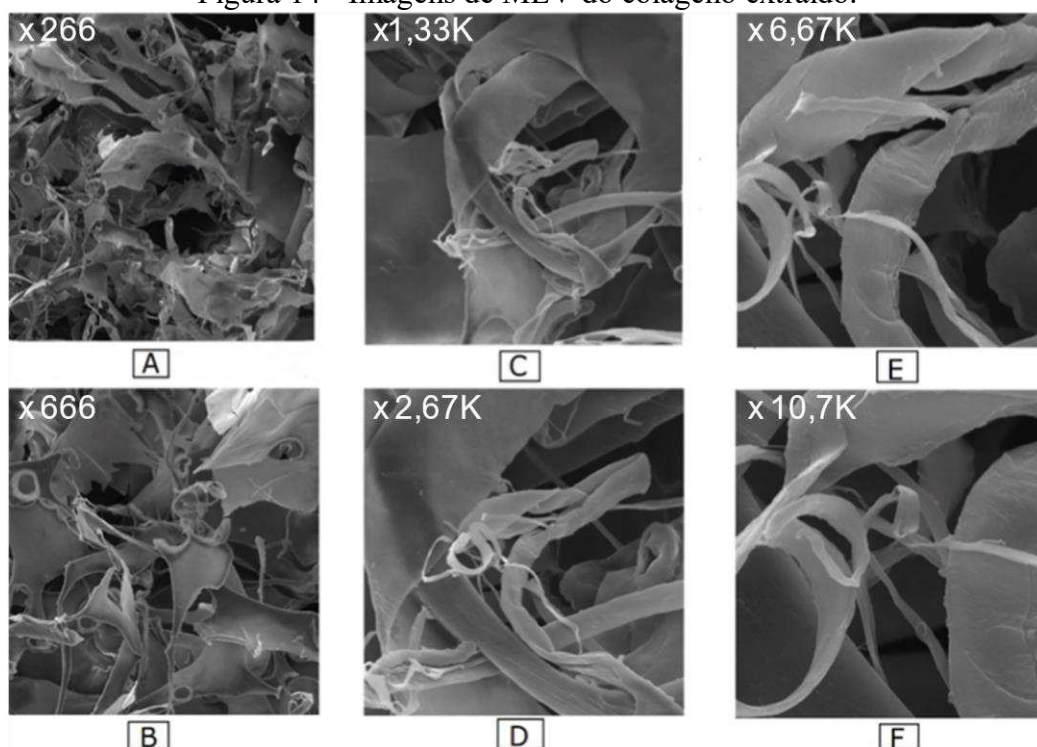
O rendimento da extração foi calculado de acordo com a equação 1. Foi obtido rendimento de 3,02% para as escamas de Tilápia do Nilo. Este rendimento foi maior comparado ao de outras espécies de peixe que apresentaram rendimento de 2,7% para carpa (*Hypophthalmichthys nobilis*) e 1,06% para badejo (*Lates calcarifer*) (LIU et al., 2012; CHUAYCHAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2015) e próximo a outros estudos com Tilápia

do Nilo, que obtiveram rendimento de 3,2% (CHEN et al., 2016). Esta diferença de rendimento pode variar devido à diferença das espécies, condições biológicas e métodos de preparo.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As características morfológicas do colágeno foram observadas pelas imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 14).

Figura 14 - Imagens de MEV do colágeno extraído.



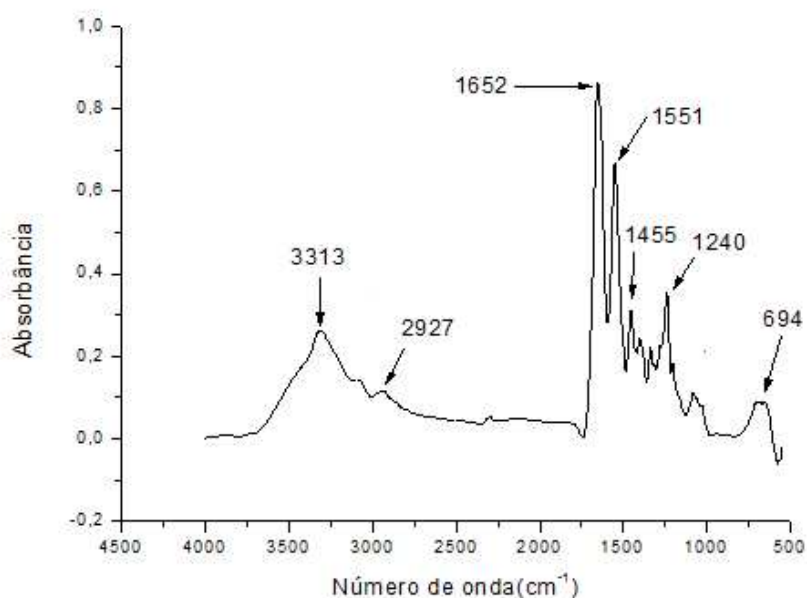
Fonte: Elaborada pela autora.

Nas imagens observa-se que o colágeno apresenta uma superfície limpa que significa a retirada de proteínas não colagenosas, segundo Wang et al (2014). As regiões parcialmente enrugadas, Figura 14 (E) e (F), deve-se ao processo de liofilização que o colágeno foi submetido antes da análise (SCHUETZ et al, 2013). Exibiu uma malha fibrosa agregada, multicamada e de aparência agregada como esperado, típico de colágeno do Tipo I, Figura 14 (A) e (B) e que permite ser usado como agente hidratante segundo Sun et al. (2017).

5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta análise foi realizada para observar os principais constituintes do colágeno. A Figura 15 mostra o espectro obtido após análise e as principais bandas estão assinaladas. Foi possível observar bandas características do colágeno (Tabela 9).

Figura 15- Espectro de FTIR do colágeno extraído.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9- Principais grupamentos observados no espectro infravermelho

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Correspondente
3313	Estiramento de grupos N-H	Amida A
2927	Estiramento assimétrico de grupos CH ₂	Amida B
1652	Estiramento de grupos C=O	Amida I
1551	Deformação de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida II
1455	Deformação de grupo C-H	-
1240	Deformação angular de grupos N-H acoplado com estiramento de grupos C-N	Amida III

Fonte: Elaborada pela autora.

A banda referente a amida A foi medida em 3313 cm⁻¹. Esse valor é comumente associado à frequência de alongamento de grupos N-H e indica a presença de ligações de

hidrogênio provavelmente com um grupo carbonila da cadeia peptídica. De acordo com Doyle et al., a vibração de alongamento N-H livre varia de 3400 a 3440 cm^{-1} , todavia desloca-se para aproximadamente 3300 cm^{-1} quando as ligações de hidrogênio estão presentes. Amida B foi medida em 2927 cm^{-1} , consistente com alongamento assimétrico de CH_2 assimétrico (SUN et al, 2017).

A banda referente à Amida I foi medida a 1652 cm^{-1} , com um valor de comprimento de onda característico no intervalo de 1600-1700 cm^{-1} , que está associado à vibração do estiramento de grupos carbonílicos acoplada a um grupo carboxila e representa um marcador da estrutura secundária da proteína. Essa observação confirma que a formação de ligação de hidrogênio entre estiramento de grupos N-H e grupos C=O (Glicina) do quarto resíduo é responsável pela iniciação da tripla hélice (SINGH *et al.*, 2011). A banda da Amida II foi medida em 1551 cm^{-1} , característico em intervalos de 1515-1570 cm^{-1} , atribuído a uma vibração de flexão do grupo N-H acoplado com uma vibração de alongamento C-N.

A banda observada em 1455 cm^{-1} está relacionada com deformação de grupos C-H presentes no anel pirrolidínico da prolina e da hidroxiprolina (VEERURAJ *et al.*, 2015). A banda da Amida III foi medida em 1240 cm^{-1} representando a combinação da vibração de estiramento C-N acoplado com a vibração das ligações de N-H.

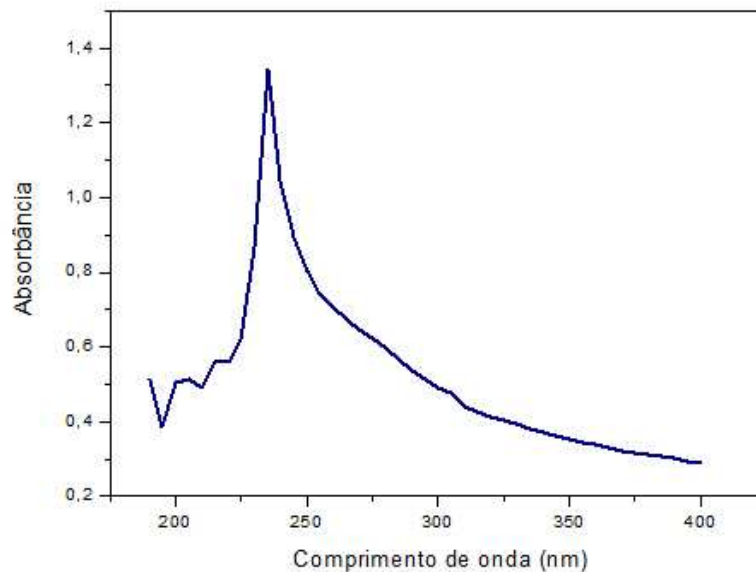
O espectro mostrou que a integridade da estrutura de tripla hélice do colágeno se manteve através da razão das absorvâncias medidas em 1240 cm^{-1} e 1455 cm^{-1} . Para materiais formatados em solução ácida, a integridade da estrutura secundária do tropocolágeno pode ser verificada quando o valor da relação A_{1240}/A_{1455} for maior ou igual à unidade (AHMAD e BENJAKUL, 2010). Para o material preparado e utilizado neste trabalho, o valor encontrado para esta relação foi de 1,1, caracterizando que a integridade da tripla hélice foi mantida e não houve desnaturação da proteína.

5.2.4 Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A análise de UV-VIS foi realizada para observar a absorvância da amostra. Na Figura 16 observa-se o espectro para o colágeno. Uma banda de intensa absorção pode ser observada no comprimento de onda de 235 nm, característica de colágeno do tipo I. Segundo Veeruraj *et al* (2015), este fato ocorre devido aos grupos C=O, -CONH₂ e -COOH estarem disponíveis na cadeia polipeptídica da proteína. A maioria das proteínas possui baixa quantidade de aminoácidos aromáticos que absorvem luz na região próxima ao ultravioleta,

por isso apresentam bandas intensas em comprimentos de onda de 280 nm (HUANG *et al.*, 2011). Como o espectro não apresentou bandas características de outras proteínas em comprimentos de 280 nm, pode-se inferir que a etapa de remoção de proteínas não colagenosas foi eficiente.

Figura 16 - Espectro de Absorção do UV-VIS para o colágeno.

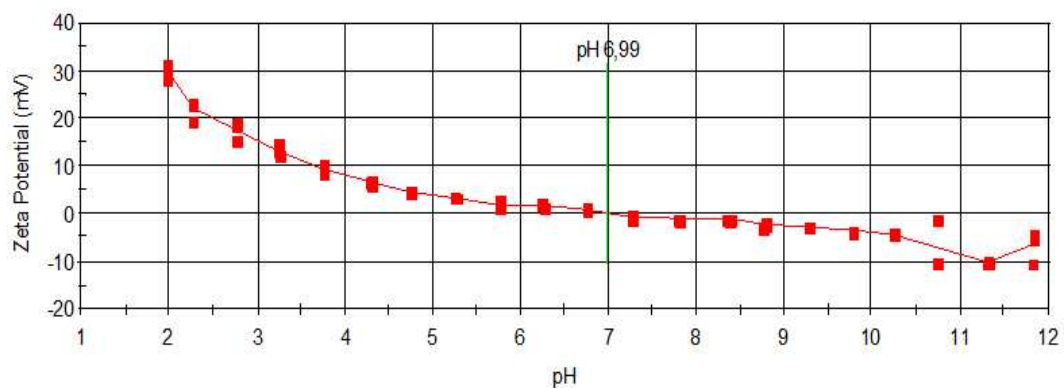


Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Ponto Isoelétrico

O Potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade das suspensões. A curva do potencial zeta em função do pH encontra-se na Figura 17.

Figura 17 - Potencial Zeta vs pH.



Fonte: Elaborado pela autora.

A amostra de colágeno estava positivamente carregada entre um pH de 2 e 6 e carregado negativamente entre um pH de 7 e 12. Os dados do potencial Zeta revelaram quando a carga líquida da amostra foi igual à zero, ou seja, seu ponto isoelétrico. A molécula de colágeno extraída da tilápia é constituída, essencialmente, por aminoácidos hidrofóbicos (prolina, hidroxiprolina e glicina). Portanto, a carga líquida formada é decorrente, quase que unicamente, da ionização dos grupamentos amino e ácido carboxílico (CHEN et al., 2016). Portanto, é esperado que o seu ponto isoelétrico se dê em pH neutro, como demonstrado experimentalmente, onde o ponto isoelétrico encontrado foi em pH = 6,99.

Quando os valores de pH estiverem acima ou abaixo dos valores de índice de polidispersividade (pI) das proteínas, a repulsão entre os as cadeias das proteínas aumentam, resultando em uma alta carga líquida e solubilidade das moléculas de proteínas. Quando a carga líquida de uma proteína for zero, as interações hidrofóbicas aumentam, resultando em precipitação e agregação de proteínas (Singh et al., 2011). O colágeno de resíduos de peixe possui diferentes valores de pI. Essas discrepâncias entre os PIs das espécies de peixes podem ser atribuídas pela pequena diferença nas suas composições de aminoácidos (AHMAD *et al.*, 2010).

5.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

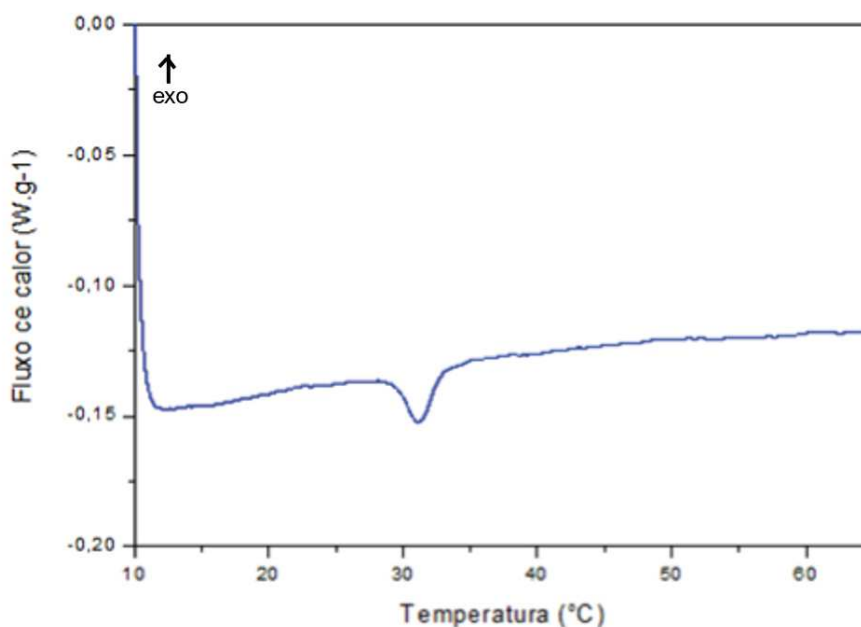
A análise de DSC foi realizada para determinar os eventos térmicos que envolvem a etapa de desnaturação do colágeno. A Figura 18 mostra a curva obtida após a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial.

Podemos observar a presença de um evento endotérmico iniciado 28,55°C, tendo seu ápice em 30,1°C. Pesquisas indicam que o aumento da temperatura acarreta na desintegração da estrutura helicoidal do colágeno em bobinas aleatórias (ZHANG et al., 2007).

A estabilidade térmica do colágeno é influenciada pelo teor de ácido imino. Quanto maior o teor de ácido imino, maior a estabilidade. A estrutura molecular do colágeno é mantida principalmente por restrições sobre as mudanças na estrutura secundária da cadeia polipeptídica, impostas pelos anéis de pirrolidina da prolina e hidroxiprolina, e também parcialmente estabilizada pela ligação de hidrogênio através do grupo hidroxila da hidroxiprolina (ZHANG et al., 2007). A estabilidade térmica da hélice tripla de colágeno é atribuída às ligações de hidrogênio da rede, mediadas por moléculas de água, que ligam o

grupo hidroxila da hidroxiprolina de uma cadeia à amida da cadeia principal ou grupos carboxílicos de outra cadeia (BABU & GANESH, 2001).

Figura 18 - Gráfico de variação do fluxo de calor versus temperatura.



Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos observar a presença de um evento endotérmico iniciado 28,55°C, tendo seu ápice em 30,1°C. Pesquisas indicam que o aumento da temperatura acarreta na desintegração da estrutura helicoidal do colágeno em bobinas aleatórias (ZHANG *et al.*, 2007).

A estabilidade térmica do colágeno é influenciada pelo teor de ácido imino. Quanto maior o teor de ácido imino, maior a estabilidade. A estrutura molecular do colágeno é mantida principalmente por restrições sobre as mudanças na estrutura secundária da cadeia polipeptídica, impostas pelos anéis de pirrolidina da prolina e hidroxiprolina, e também parcialmente estabilizada pela ligação de hidrogênio através do grupo hidroxila da hidroxiprolina (ZHANG *et al.*, 2007).

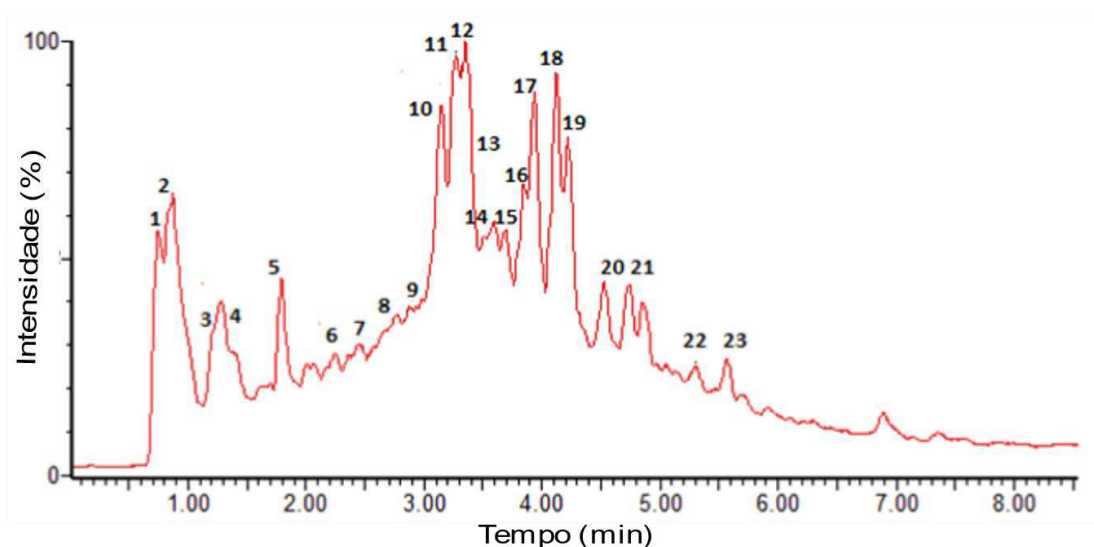
A estabilidade térmica da hélice tripla de colágeno é atribuída às ligações de hidrogênio da rede, mediadas por moléculas de água, que ligam o grupo hidroxila da hidroxiprolina de uma cadeia à amida da cadeia principal ou grupos carboxílicos de outra cadeia (BABU;GANESH, 2001).

5.3 Caracterização do extrato aquoso das folhas de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*)

5.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

Para obter uma caracterização mais detalhada dos extratos de *P. niruri*, foi realizada uma análise UPLC-QTOF-MS^E, resultando em um cromatograma mostrado na Figura 21, uma vez que é uma técnica capaz de identificar compostos com alta precisão e diferenciação de íons com aproximadamente a mesma massa. Além disso, ele também pode fornecer informações sobre a estrutura química dos constituintes através da fragmentação em massa (MS / MS). No Apêndice A apresenta um resumo dos compostos identificados nos extratos de *Phyllanthus niruri*.

Figura 19- Cromatograma do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*



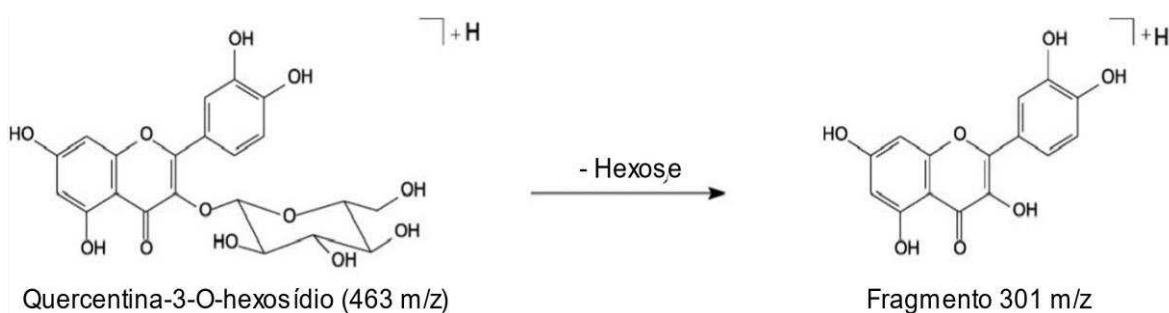
Fonte: Elaborado pela autora.

A maioria dos picos de ácidos do extrato de *Phyllanthus niruri* foi observada em modo negativo mostrando os íons desprotonados $[M-H]^-$ com a perda de uma unidade de massa, referente ao hidrogênio ionizável. Os ácidos mucico, quínico e chebúlico apresentaram íons fragmentados em 209, 191 e 355 m/z, respectivamente. O ácido chebúlico foi identificado com base em seu padrão de fragmentação com íons em 355 m/z, referente ao íon desprotonado, $[M-H]^-$, 337 m/z, referente a perda de água do íon desprotonado $[M-H-H_2O]^-$ e 711 m/z, que representa a união de duas moléculas do ácido chebúlico, $[2M-H]^-$. Para o ácido gálico, dois íons característicos foram observados em 169 m/z referentes a $[M-H]^-$ e 125 m/z, atribuído à perda neutra de CO_2 $[M-H-CO_2]^-$. Para o ácido tuberônico foi observado dois

fragmentos característicos. Os íons 387 m/z, referente ao íon desprotonado, $[M-H]^-$ e 207 m/z, característicos da quebra da hexose, $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$.

Os flavonóides, metabólito secundário presente no extrato de *Phyllanthus niruri*, que tem como estrutura básica três anéis, sendo dois deles aromáticos e outro com a presença de um heteroátomo, podem se apresentar na forma glicosilada, como por exemplo a Quercentina-3-O-hexosídeo, apresenta íon fragmento em 463 m/z $[M-H]^-$ e 301 $[MH-Hex]^-$, referente à molécula desprotonada e à perda de hexose, respectivamente.

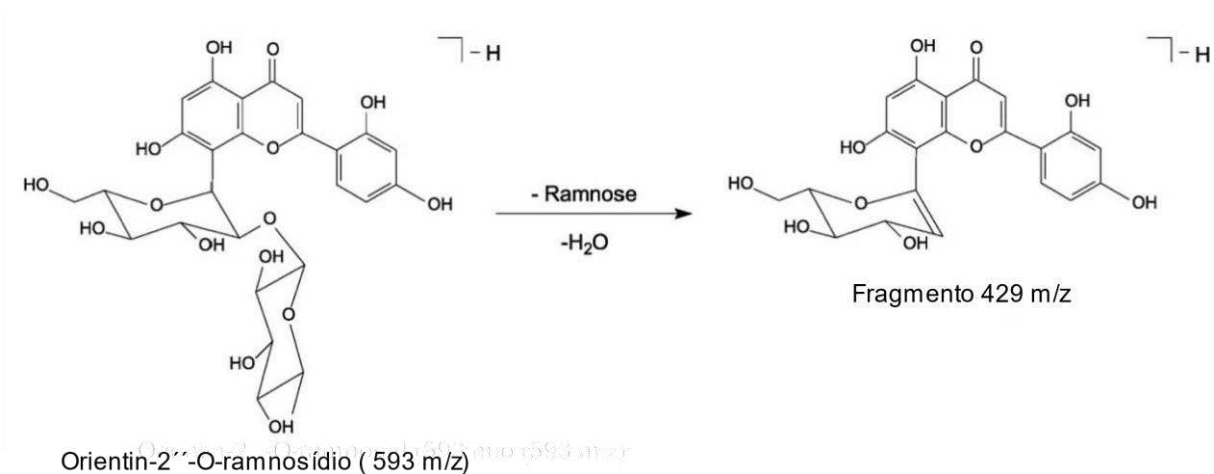
Figura 20 - Proposta de fragmentação.



Fonte: Sousa (2017, com adaptações).

Orientin-2''-O-ramnosídeo e vitexin-2''-O-ramnosídeo são flavonas C-glicosiladas, uma subclasse de flavonoides que possui uma unidade de açúcar ligada ao anel benzeno A. Neste caso, os flavonoides têm uma ramnose ligada à aglicona por uma ligação O-glicosídica e logo possui íons fragmentos característicos no espectro de massa permitindo uma identificação precisa, justamente pela perda dessa ramnose e glucose.

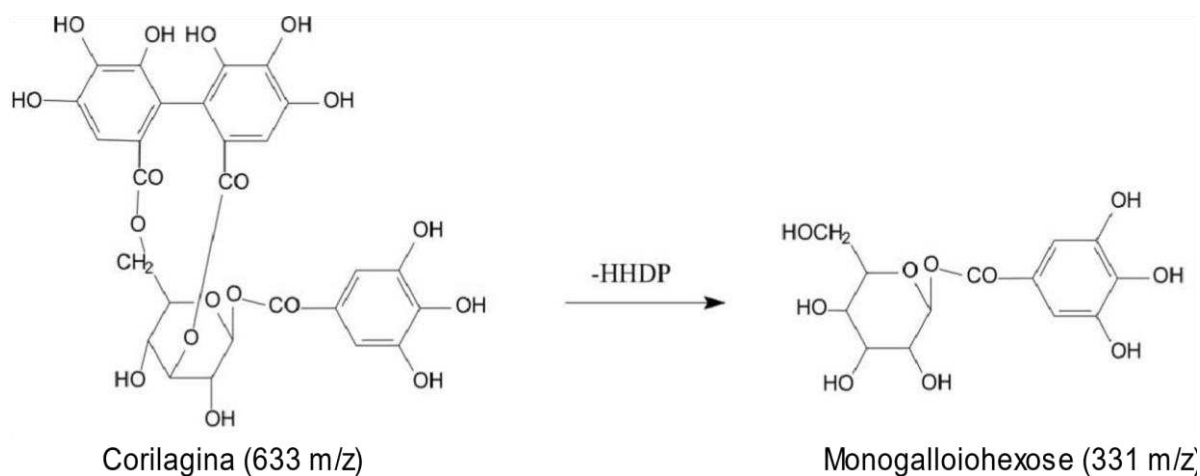
Figura 21 - Proposta de fragmentação.



Fonte: Sousa (2017, com adaptações).

Os elagitaninos são taninos hidrolisáveis e, muitas vezes, nos seus espectros de massa fornecem um fragmento em 301 m/z, devido à perda de um grupo hexahidroxi-difenil (HHDP). Geraniina, corilagina, phyllanthusina C e U e ácido repandusínico A são exemplos de compostos caracterizados como elagitaninos encontrados em extratos de *Phyllanthus niruri*. Furosina também é um tanino hidrolisável e também foi identificado no extrato analisado neste trabalho.

Figura 7 - Proposta de fragmentação.



Fonte: Sousa (2017, com adaptações).

5.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH e ABTS⁺

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm. Na Figura 23, o gráfico demonstra que há um aumento da inibição desse radical a medida que se aumenta a concentração do extrato no meio, atingindo 85% de inibição em uma concentração de 100 µg/mL. Este extrato apresenta alta atividade antioxidante com IC₅₀ igual a 42,72. Outros estudos com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* apresentaram resultado semelhante de 47,9 µg/mL (SABIR; ROCHA, 2008).

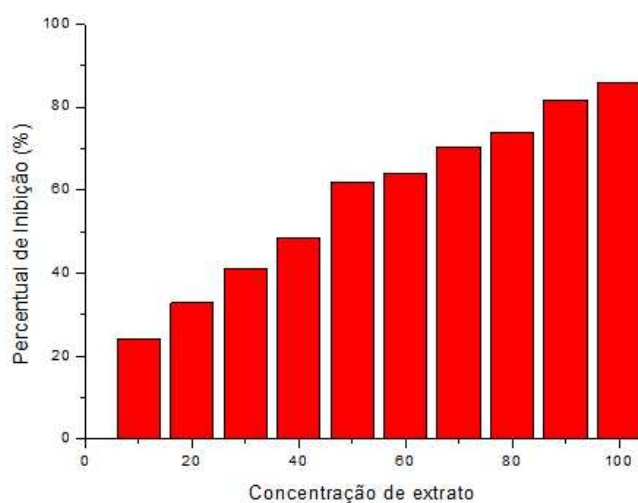
Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O valor da atividade antioxidante é expresso em µM trolox/g de extrato utilizado.

A absorvância para 1000 μM trolox foi igual a 0,4374, calculada pela equação da reta igual a $y = -0,0003x + 0,7374$. A equação da reta para a amostra de extrato aquosa de *Phyllanthus niruri* foi de $y = 2\text{E}^{-05}x + 0,272$ e o valor de trolox calculado foi de $120,92 \pm 0,05 \mu\text{M}$ trolox/g.

Este valor corrobora ao resultado do método com DPPH, apresentando alta atividade antioxidante, mais alto do que observado em outros trabalhos como o de Amin *et al.* (2012) que encontrou valor de $46.44 \pm 0.53 \mu\text{M/g}$ para o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*.

Figura 23 - Percentual de Inibição do radical DPPH.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Desenvolvimento das emulsões

5.4.1 Determinação do EHL requerido para o óleo de girassol

O valor do EHL requerido para um óleo é determinado empiricamente preparando diferentes emulsões com diferentes porcentagens de tensoativos variando o valor de EHL. Para atingir um maior grau de estabilidade dos glóbulos, a combinação de emulsificantes hidrofílicos e lipofílicos é frequentemente usada, resultando em maior rigidez e força na interface da emulsão (LI et al., 2010), ou seja, esse valor descreve a estabilidade máxima da emulsão. Um valor baixo indica afinidade pela fase oleosa, enquanto um valor alto indica afinidade pela fase aquosa (ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 1999).

Para o estudo do valor de EHL requerido do óleo de arroz, foi testado com o par de tensoativo Polissorbato 80 (EHL = 15,0) e o Mono-oleato de sorbitano (EHL = 4,3) em diferentes concentrações, utilizando 5,00% da mistura dos dois tensoativos (Tabela 1).

Foi observada nítida separação das fases da emulsão após 24 horas do preparo em todos os valores de EHL, exceto com as formulações N2 e N3. Porém após centrifugação, ocorreu separação de fases na N2 e cremeação na N3, conseqüentemente, esta proporção de tensoativos não estabilizava a emulsão.

Sendo assim, esse par de tensoativo foi testado também na concentração de 10,00% (Tabela 2) e, macroscopicamente, após 24 horas, as emulsões nos valores de EHL 5,0 (T2), 6,0 (T3) e 7,0 (T4) foram submetidas à centrifugação. Todas as três emulsões se apresentaram estáveis. O tamanho dos glóbulos diminui com o aumento da quantidade de tensoativo. Isso ocorre devido ao aumento da área interfacial do tensoativo e diminuição na tensão interfacial.

Na análise granulométrica, os tamanhos de glóbulo dessas emulsões estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Tamanho de partícula das emulsões T2, T3 e T4.

Formulação	Tamanho de Partícula (nm)
T2	229,6 ± 1,33
T3	216,1 ± 3,33
T4	145,6 ± 1,68

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com Gupta et al (2016), nanoemulsões possuem tamanho de partícula variando de 20-500 nm, portanto foram formadas emulsões nos três casos. Essas três emulsões são de aspecto leitoso devido ao tamanho dos glóbulos serem superiores a 100 nm.

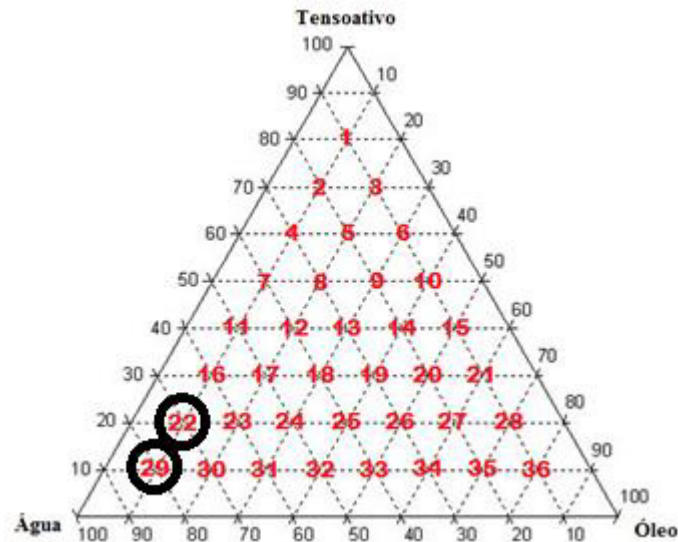
Como todas as emulsões apresentaram comportamento estável, pode-se afirmar que o EHL requerido para o óleo de girassol está na faixa de 5,0 – 7,0, e o valor de EHL 7,0 foi escolhido para dar continuidade às outras análises, pois apresentou menor tamanho de glóbulo.

5.4.2 Diagrama Ternário

O sistema estudado consistiu de 36 emulsões com EHL referente a 7,0. Na Figura 24 está assinalada as regiões que houve formação de emulsão, neste caso, amostras que depois de 24 horas não separam as fases e não cremearam.

As amostras 29 e 22 foram submetidas a centrifugação, e apenas a formulação 29 permaneceu estável, a emulsão 22 apresentou quebra, separando em duas fases. As características macroscópicas da amostra 29 foi analisada e seu tamanho de partícula foi medido (Tabela 11).

Figura 23- Regiões de formação de emulsões.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11- Características da amostra 29

Amostra	Água (%)	Óleo (%)	Tenssoativo (%)	Tamanho de Partícula (nm)	Características macroscópicas
29	80	10	10	140,8	Emulsão fluída e semi translúcida

Fonte: Elaborada pela autora.

O estresse térmico foi realizado na emulsão 29 para estudar a sua estabilidade mediante condições mais críticas, neste caso, a temperatura (Tabela 12).

Tabela 12 - Teste de estresse térmico da amostra 29.

Temperatura	40	45	50	55	60	65	70	75	80
Amostra 29	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: N – normal, LM – levemente modificada, M – modificada, IM: intensamente modificada.

Em todas as temperaturas a emulsão se manteve homogênea, não apresentando nenhuma característica de instabilidade.

Sabe-se que grande quantidade de tensoativo pode causar irritação na pele, por isso quanto menor a quantidade de tensoativos para se obter uma nanoemulsão estável melhor (BABOOTA *et al.*, 2007). Pesquisando composições com menor concentração de tensoativo e que proporcione a obtenção de sistema monodisperso estável, para a sequência da pesquisa foi traçado o pseudodiagrama de fases com o estreitamento de 5,00 em 5,00% dos componentes do diagrama ao redor da formulação 29.

5.4.3 Pseudodiagrama ternário

Os pontos traçados ao redor da nanoemulsão 29 resultaram em seis formulações e todas foram feitas com o EHL equivalente a 7,0 (Tabela 13).

Tabela 13 - Quantificação dos componentes das formulações vizinhas a 29.

Formulação	Água	Óleo	Tensoativo
I	80%	5%	15%
II	75%	10%	15%
III	75%	15%	10%
IV	80%	15%	5%
V	85%	10%	5%
VI	85%	5%	10%

Fonte: Elaborada pela autora

As amostras foram analisadas após 24 horas e todas permaneceram estáveis. Então foram submetidas à centrifugação e as amostras I e VI separam as suas fases. Este efeito deve ter ocorrido devido à quantidade de tensoativo de 5%. Em um sistema pobre de tensoativo, a taxa de coalescência é significativa porque não há quantidade suficiente para estabilizar por inteiro a nova interface. Uma concentração moderada de tensoativo causa uma considerável diminuição do tamanho dos glóbulos, pois esta é capaz de melhor estabilizar a área interfacial (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008). As formulações III e IV possuem uma quantidade alta de tensoativos que pode vir a irritar o tecido cutâneo, portanto os estudos prosseguiram apenas com as formulações II e V.

O tamanho de partícula dessas formulações foi medido para definir se estas seriam melhores que a formulação 29 (Tabela14).

A formulação 29 foi a que apresentou menor tamanho de glóbulos e, portanto, será definida como formulação base para os próximos estudos nos quais o colágeno e os ativos serão adicionados.

Tabela 14- Comparação entre as formulações 29, I e V.

Amostra	Tamanho de Partícula (nm)	Características macroscópicas
29	140,8	Emulsão fluída e semi translúcida
II	196,2	Emulsão fluída e Aspecto Leitoso
V	199,1	Emulsão fluída e Aspecto Leitoso

Fonte: Elaborada pela autora

5.5 Caracterização das emulsões

5.5.1 Caracterização das emulsões à base de colágeno

Primeiramente, foi estudado como a emulsão desenvolvida no item 5.4 se comportaria com a adição de colágeno. Portanto, emulsões com concentrações de colágeno variando de 0,1 a 1,5% (Tabela 3) foram feitas e analisadas.

Para todas estas emulsões contendo colágeno, foi adicionado ácido cítrico para facilitar a solubilização do colágeno. Este ácido foi escolhido, pois é usado na indústria cosmética e alimentícia. Portanto, não causaria irritabilidade a pele, diferentemente do ácido acético, comumente utilizado para solubilizar o colágeno.

Após 24 horas, apenas as nanoemulsões C1, C2 e C3 permaneceram estáveis. As emulsões então foram submetidas à centrifugação e todas as três permaneceram homogêneas. Seguidamente as amostras foram submetidas ao teste de estresse térmico, tamanho de partícula, pH e condutividade (Tabela 15).

Tabela 15- Propriedades medidas das emulsões C1, C2 e C2.

Amostra	Tamanho de Partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	pH	pH após 15 dias	Condutividade ($\mu\text{s/cm}$)
C1	634,6	0,477	-48,4	3,81	3,83	436,8
C2	670,5	0,496	-45,8	4,0	4,1	496,3
C3	713,8	0,509	-43,00	4,2	4,3	555,2

Fonte: Elaborada pela autora.

As três formulações apresentaram aumento no tamanho dos glóbulos e não estão mais na faixa de nanoemulsão. A adição de colágeno causou interferência na formação de glóbulos pequenos, pois aumentou a tensão interfacial devido ao aumento da viscosidade da fase contínua.

O índice de polidispersividade (PDI) revela a qualidade da dispersão, variando de valores de 0,1 até 1. Medidas abaixo de 0,2 indicam uma pequena distribuição, enquanto valores próximos de 1 são obtidos para amostras com baixa qualidade, ou seja, para sistemas polidispersos (JAFARI et al., 2008) que foi o caso observado nas três formulações.

A condutividade elétrica pode ser um parâmetro indicativo de instabilidade e influenciar na granulometria das emulsões, uma vez que o aumento pode estar relacionado com a coalescência, logo estes valores elevados de condutividade inferem um sistema instável.

Não ocorreu alterações significativas dos valores de pH dessas amostras. Alterações no valor do pH indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano. Um decréscimo nos valores pode ser decorrente da oxidação da fase oleosa ou da hidrólise de triglicerídeos, gerando ácidos graxos livres (MASMOUDI et al., 2005; PEREIRA 2008). O pH de produtos dérmicos é um fator importante para evitar irritação da pele e para não deixá-la suscetível à infecção bacteriana. É interessante que formulações tópicas apresentem valores ligeiramente ácidos, uma vez que o pH cutâneo se encontra em torno de 4,5 a 6. As formulações apresentam valores abaixo do esperado para sua aplicação (CLARES et al., 2014).

O potencial zeta fornece uma medida da força elétrica repulsiva entre as partículas. Todas as três emulsões apresentaram valor de potencial zeta adequado, indicando estabilidade das mesmas. De acordo com a literatura, para alcançar um sistema eletrostaticamente estável, é necessário um potencial zeta igual ou maior a 30 mV, em módulo (TRAN et al., 2014).

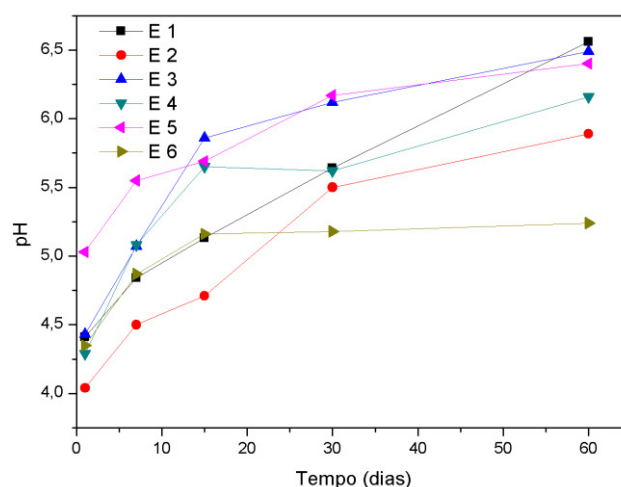
Portanto, pode-se afirmar que as emulsões adicionadas de colágeno mudaram todas suas propriedades, então é preciso estudar meios que melhorem suas propriedades diante desse novo componente na emulsão ou encontrar a melhor concentração.

Os primeiros testes realizados demonstraram propriedades macroscópicas promissoras, portanto estudo mais profundos foram realizados para essas formulações. Os gráficos demonstrados nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27 mostram os valores obtidos para o pH, a condutividade, tamanho de glóbulos, potencial zeta e índice de polidispersividade. Todas

essas análises foram realizadas no período de 60 dias, e medidas em 1, 7, 15, 30, e 60 dias após a formulação. As amostras ficam acondicionadas sob proteção da luz e à temperatura ambiente após cada análise.

No primeiro gráfico mostrado na Figura 24, estão os valores de pH no período de 60 dias, para as 6 formulações.

Figura 24 - pH x Tempo das emulsões.



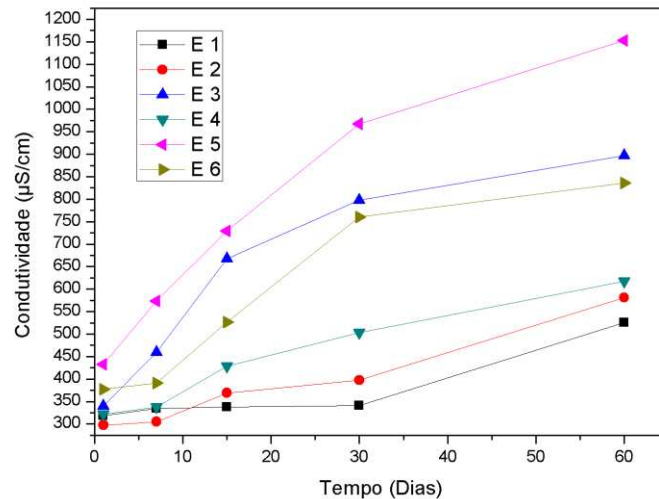
Fonte: Elaborada pela autora.

A determinação do valor de pH ao longo de um período é importante para formulações tópicas, pois precisam estar de acordo com o pH da pele. O pH da pele é levemente ácido, variando de 4,1 a 6,0 (SEGGER et al, 2007; CLARES et al., 2014). Formulações tópicas devem apresentar pH dentro dessa faixa para não causar irritação cutânea e proliferação de bactérias.

As emulsões E2, E4 e E6 estão em faixa de pH compatível com o pH cutâneo. As emulsões 1, 3 e 5 estão um pouco acima, porém ainda levemente ácido, não chegando a faixa de pH básico. A alteração de pH observada nas seis formulações é decorrente de reações químicas ou crescimento bacteriano. É provavelmente proveniente do processo oxidativo dos componentes da emulsão, principalmente do óleo vegetal que auto oxida quando em contato com o calor ou ar atmosférico (AUTON, 2005).

No gráfico mostrado na Figura 25, possui os valores de condutividade no período de 60 dias, para as 6 formulações.

Figura 25 - Condutividade x Tempo das emulsões.



Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo SALAGER (2000) a variação de condutividade depende também da média e da distribuição de tamanhos de gota, porém não é muito sensível a estes parâmetros, a menos que ocorra grandes mudanças em suas características. Isso significa dizer que a condutividade de uma emulsão varia com a proporção de sua fase contínua, neste caso, da água.

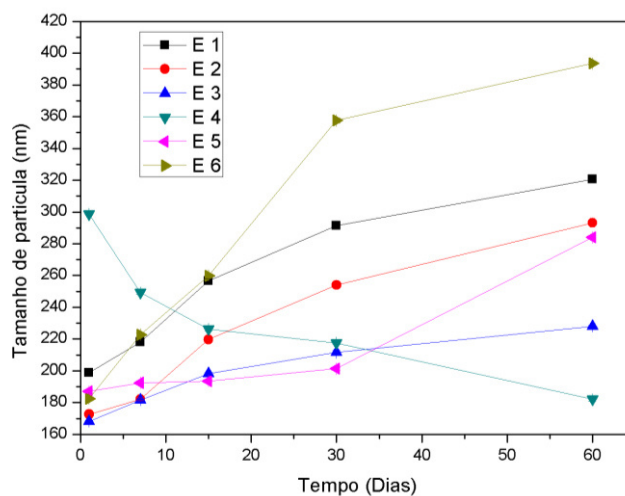
As emulsões E3, E5 e E6, apresentando altas variações no valor de condutividade, principalmente a emulsão 5. As outras apresentaram maior estabilidade em relação a esse parâmetro. Este aumento pode ser decorrente da coalescência dos glóbulos (ANVISA, 2004).

No gráfico mostrado na Figura 26, estão os valores de Tamanho de partícula no período de 60 dias, para as 6 formulações.

O tamanho dos glóbulos é a principal característica das emulsões, além de ser um parâmetro de suma importância para sistemas emulsionados de aplicação tópica pois é o fator responsável pela permeação de componentes ativos através da pele.

Como a emulsificação é um processo de agitação aleatória, a emulsão resultante é dada por um sistema polidisperso onde gotas pequenas e grandes coexistem (SALAGER, 2000).

Figura 26 - Tamanho de partícula x Tempo das emulsões.



Fonte: Elaborada pela autora.

O pequeno diâmetro dos glóbulos das emulsões, está associado à composição, ao método utilizado e, ao modo como esse método foi executado (IZQUIERDO et al., 2004; MORAIS et al., 2006). Segundo Pereira (2008) glóbulos menores são formados por alta velocidade de agitação e baixo fluxo de adição da fase aquosa.

A quantidade de tensoativo está relacionada com o tamanho de glóbulos pois quanto maior a quantidade de tensoativos menor será a tensão interfacial, logo menor serão as micelas formadas (MILLER; HENNING; GRUNBEIN, 2001).

Os tamanhos dos glóbulos são reduzidos quando toda fase oleosa se solubiliza completamente, esse é dos motivos da mudança do valor do tamanho dos glóbulos. Segundo Solans *et al* (2005), talvez o tempo zero de análise deveria ser mais do que 24 horas para a emulsão estivesse totalmente estabilizada.

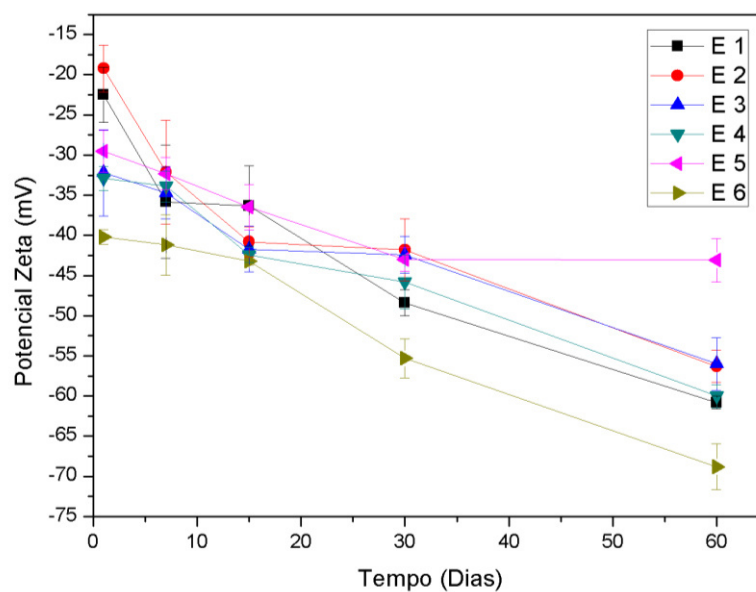
Entre as formulações podemos perceber que existe um aumento do tamanho dos glóbulos, exceto na formulação 4. Nas emulsões que ocorreram o crescimento dos glóbulos é, então, explicado pela coalescência limitada dos glóbulos menores (mais instáveis) em favor do aumento das partículas maiores, através do processo de Ostwald ripening (“maturação de Ostwald”). O processo de Ostwald ripening consiste em um fenômeno em que partículas pequenas em suspensão tendem a se redissolver e aderir na superfície das partículas maiores, diminuindo a área interfacial buscando um sistema de maior estabilidade termodinâmica (SOUSA FILHO; SERRA, 2015).

Em relação a emulsão 4 pode estar ocorrendo processo inverso, no qual as partículas ainda estão se estabilizando e formando glóbulos de menores tamanho.

No gráfico mostrado na Figura 27, possui os valores de Potencial Zeta no período de 60 dias, para as 6 formulações.

O valor do potencial zeta também é um parâmetro de estabilidade, que indica que a carga que existe na superfície das partículas e a repulsão eletrostática que existe entre elas. Quanto maior o potencial zeta, maior a repulsão eletrostática entre as partículas, havendo menor probabilidade de agregação entre os glóbulos (GUPTA e GHOSH, 2014; KADAM et al., 2014; TAMJIDI et al., 2014).

Figura 27 - Potencial Zeta x Tempo das emulsões.



Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as formulações se mostraram estáveis frente a esse parâmetro. A formulação 5 foi a que apresentou menor valor de potencial zeta, mas ainda dentro do valor que infere estabilidade.

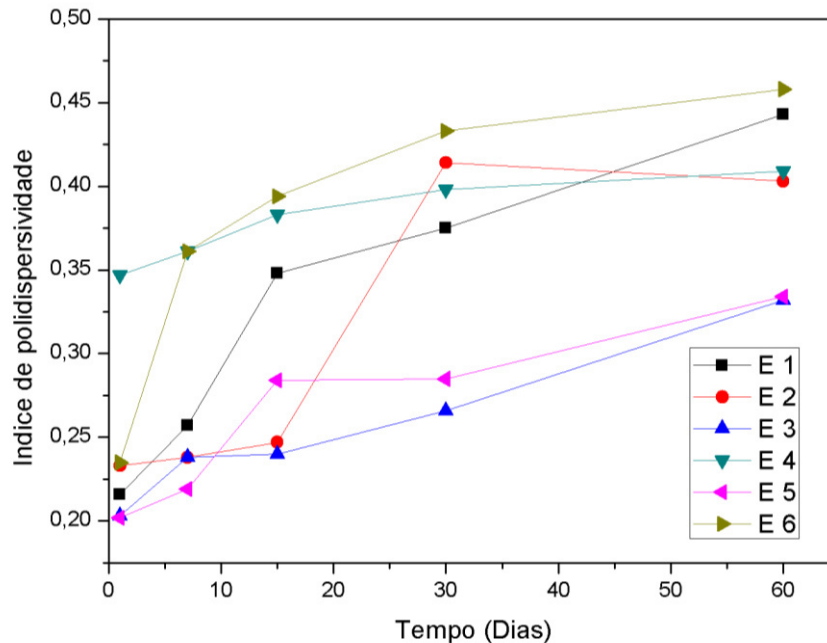
No gráfico mostrado na Figura 28, possui os valores do Índice de polidispersividade no período de 60 dias, para as 6 formulações.

O último parâmetro de avaliação das emulsões foi o índice de polidispersividade que indica a qualidade da dispersão das partículas. Esses valores variam de 0,1 a 1. Valores próximos de 1, indicam que o sistema é polidisperso, ou seja, um material de baixa qualidade quando se refere a emulsões (JAFARI et al, 2008).

Observa-se que a taxa de aumento do pdI apresenta uma menor variação nas emulsões 3 e 4, e um aumento considerável nas outras emulsões. Os valores finais não estão

tão próximos de 1, mas quanto menor o valor menos polidisperso esse material vai ser e de melhor qualidade.

Figura 28 - Gráfico Índice de polidispersividade x Tempo das emulsões.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.2 Caracterização das emulsões à base de colágeno adicionadas do princípio ativo: *Extrato Aquoso de Phyllanthus niruri*

Após analisar todas as seis formulações, a que apresentou as melhores características pelo menos na maioria dos parâmetros analisados foi escolhida para ser adicionada o princípio ativo, no caso extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*. A emulsão E4 foi escolhida para se realizar os testes posteriores e feita seis formulações adicionadas de extrato: F1, F2, F3, F4, F5 e F6.

Das seis propostas de formulações apenas a F1 (100 µg de extrato) permaneceu estável quando submetido ao teste de estabilidade intrínseca e centrifugação.

Sendo assim, os testes de estabilidade foram feitos num período de 90 dias, e os valores medidos em 1, 15, 30, 60 e 90 dias após o período de formulação. Os resultados das medidas foram plotados em um gráfico e analisados. Na Tabela 16, estão os valores para todas as análises nos 90 dias.

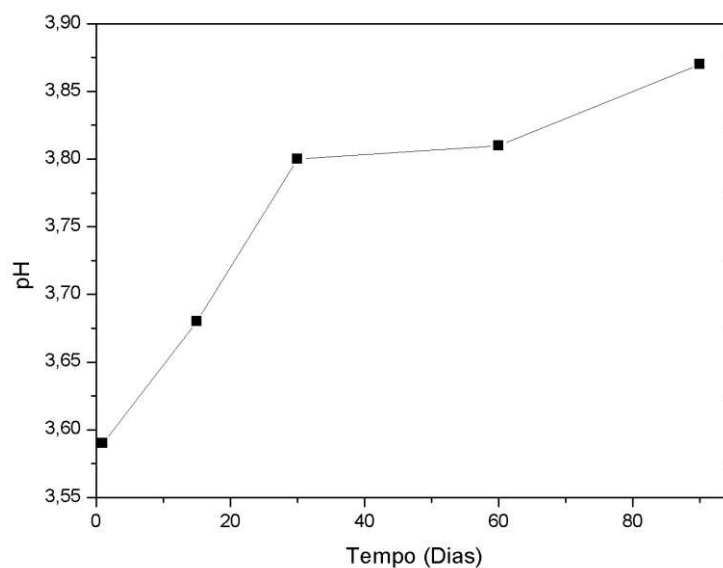
Tabela 16 - Valores das análises para formulação F1.

DIAS	pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	pDI
1	3,59	120,69	305,6	-10,4	0,361
15	3,68	123,33	308,5	-11,6	0,390
30	3,80	127,84	433,3	-11,6	0,492
60	3,81	133,43	456,2	-13,1	0,508
90	3,87	134,54	694,5	-17,8	0,518

Fonte: Elaborada pela autora.

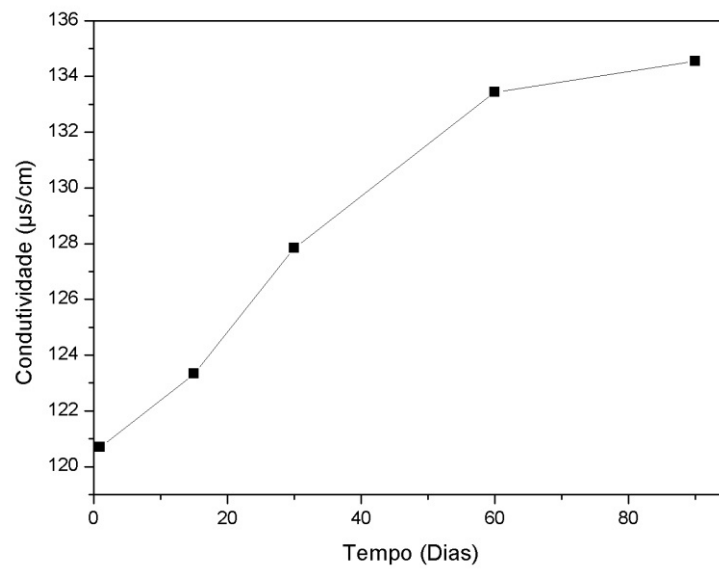
Nas Figuras 29, 30, 31, 32 e 33, têm-se os gráficos referentes ao pH, condutividade, tamanho, potencial zeta e índice de polidispersividade, respectivamente, da emulsão F1.

Figura 29 - pH x Tempo.



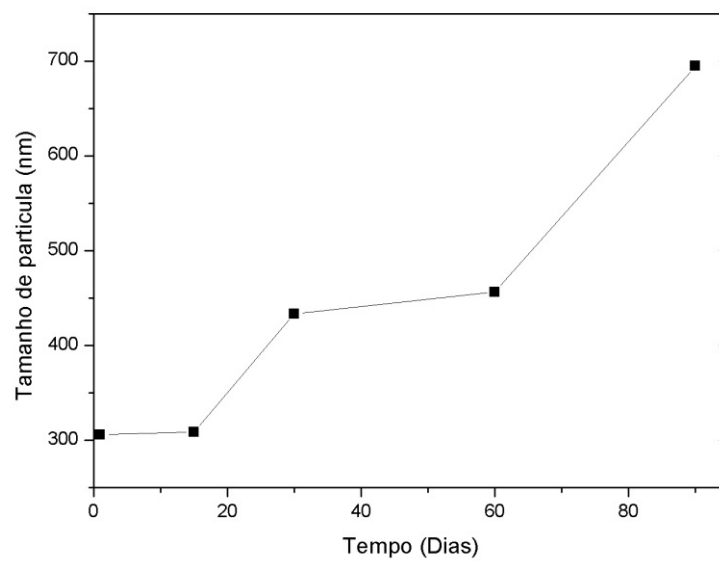
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 - Condutividade x Tempo.



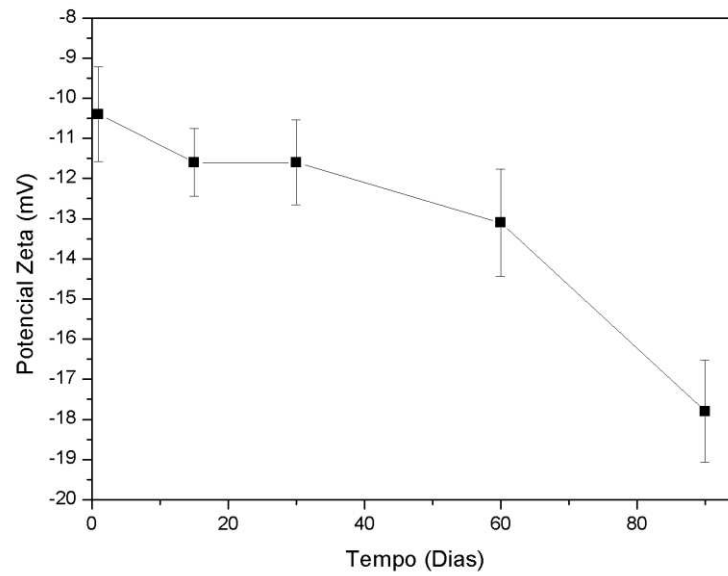
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 - Tamanho de partícula x tempo.



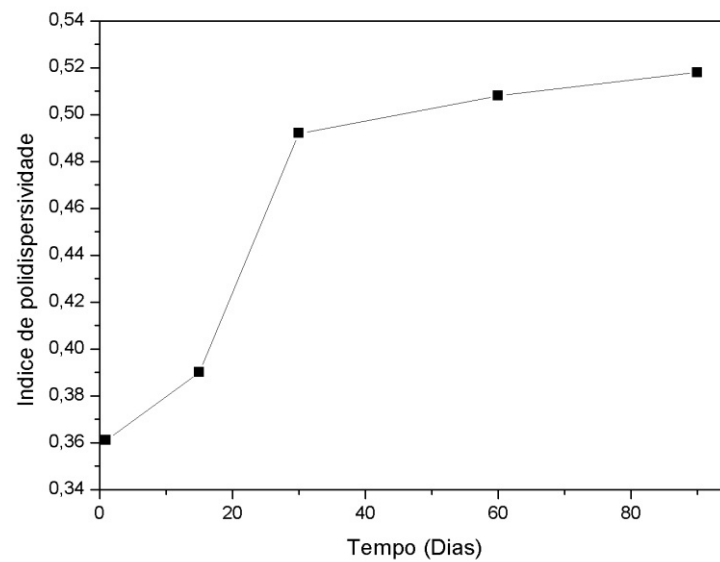
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 32 - Potencial Zeta x tempo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Índice de Polidispersividade x tempo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Mediante os resultados, observou-se que a adição de um ativo com uma grande quantidade de moléculas com diferentes estruturas mudou as propriedades da emulsão base.

Portando algumas medidas foram tomadas para tentar reverter estas características, a adição de um antioxidante, um antimicrobiano e a solubilização do colágeno na menor quantidade possível de ácido cítrico.

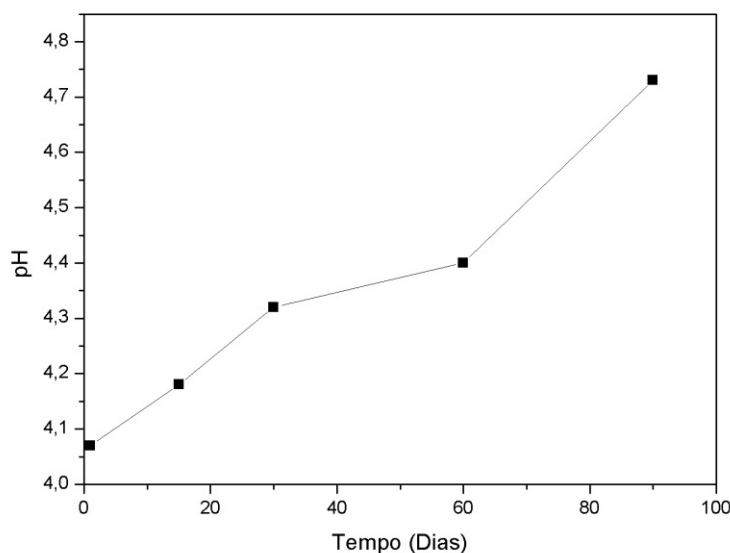
Também o tempo de gotejamento da fase aquosa sobre a fase oleosa também foi mudada, além da espessura da seringa utilizada. Na Tabela 17 estão os valores e as Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 estão os gráficos dos parâmetros de estabilidade para a emulsão F'1.

Tabela 17 - Valores dos parâmetros da emulsão F'1.

DIAS	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	PdI
1	4,07	140,50	256,9	-25,6	0,308
15	4,18	144,25	259,6	-26,4	0,336
30	4,32	146,58	264,3	-27,9	0,359
60	4,40	147,65	275,6	-29,8	0,364
90	4,73	149,62	281,2	-31,2	0,396

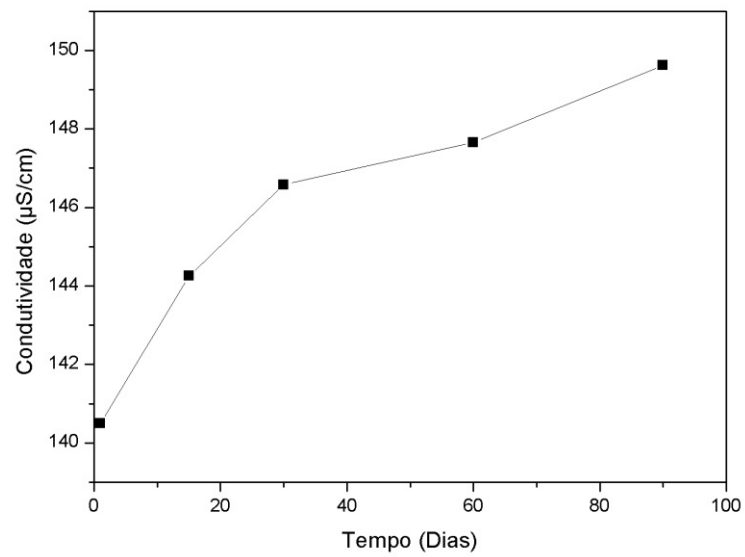
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 34 - pH x tempo da emulsão F'1



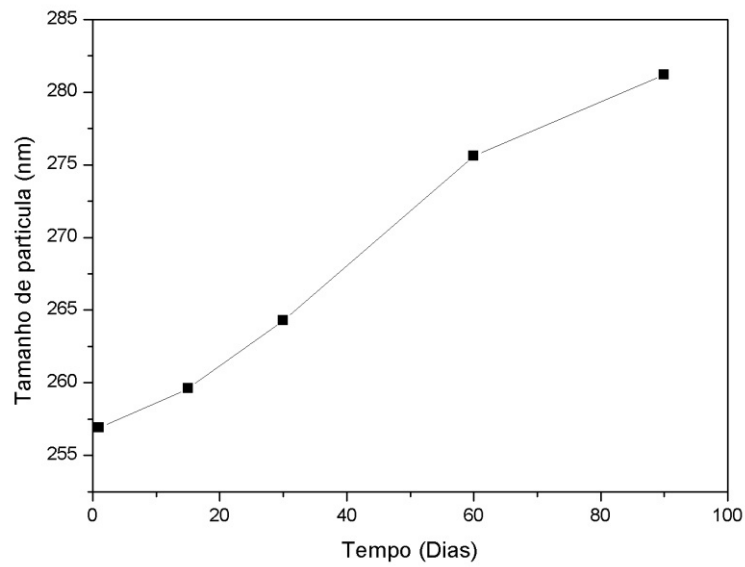
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Condutividade x tempo da emulsão F'1.



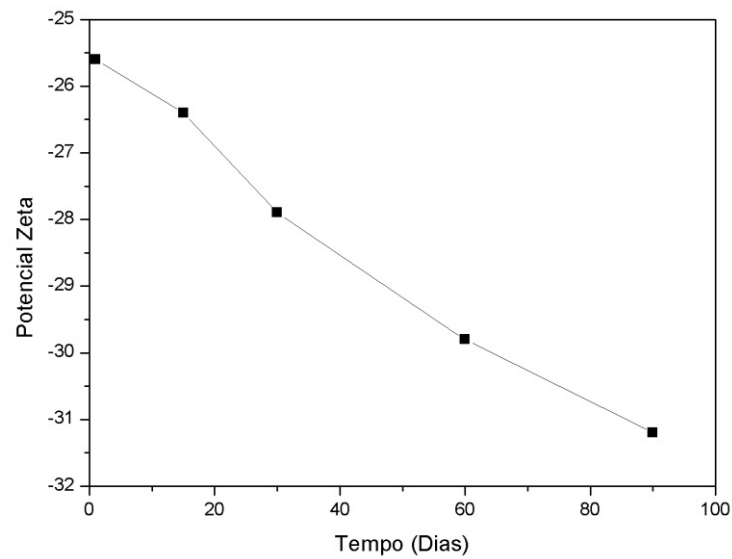
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 36 - Tamanho de partícula x tempo da emulsão F'1.



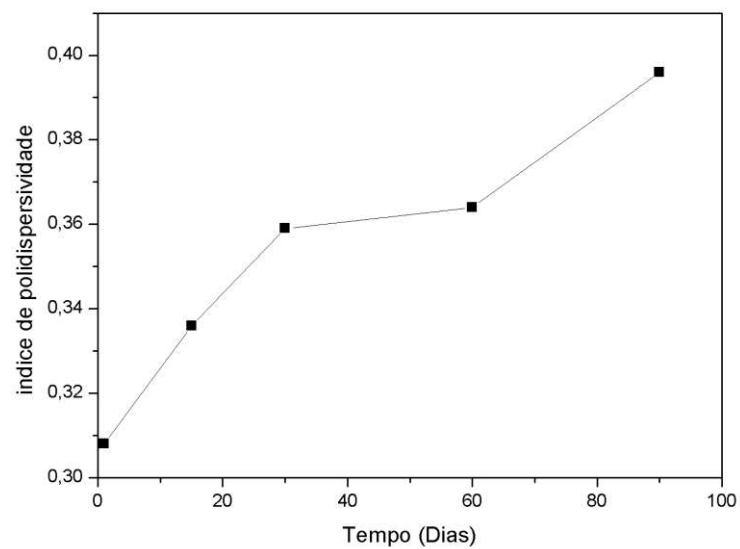
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 37 - Potencial zeta x tempo da emulsão F'1



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 38 - Índice de polidispersividade x tempo da emulsão F'1.



Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os resultados, observa-se uma melhora nos valores dos parâmetros de estabilidade da emulsão. O pH entrou na faixa de aplicação tópica, isso deve-se pela adição do

BHT e DMDM que são conservantes que podem ter interferido nessa queda do valor de pH, impedindo a oxidação do óleo vegetal e proliferação bacteriana na emulsão.

Também apresentou bastante melhora o valor do potencial zeta, que na última análise apresentou uma boa estabilidade, provavelmente atrelado a redução do tamanho dos glóbulos e da polidispersão das partículas na emulsão. Isso pode ter acontecido pela a forma de preparação ter sido modificada na hora da adição da fase aquosa sobre a fase oleosa. Um menor fluxo auxiliou na formação de gotas menores e menor tamanho de partículas, isso influenciou na estabilidade da emulsão, pois esse parâmetro interfere nos outros. Portanto, testes de citotoxicidade foram realizados na emulsão com extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e no extrato bruto.

5.5.3 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas – Teste do MTT

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT é comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade, grandes centros de referência utilizam esse método, como o programa de screening do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 substâncias a cada ano (SKoEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983) e permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As concentrações que induzem 50% do crescimento celular foram calculadas em $\mu\text{g}/\text{m}$. Os dados detalhados da atividade citotóxica das amostras testadas estão representados na Tabela 18.

O extrato bruto apresentou IC_{50} determinada apenas na linhagem leucêmica, nas demais o mesmo apresentou IC_{50} maior que 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (maior concentração de teste). A amostra F1 apresentou percentual variando de 17,34 a 85,84 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A formulação F1 apresentou baixa citotoxicidade, com percentual equivalente a emulsão pura.

Tabela 7 - Atividade citotóxica in vitro de compostos contra linhagens de células tumorais.
IC₅₀ µg/mL (Intervalo)*

Amostra	PC3 (Próstata)	SNB-19 (Astrocitoma)	HCT-116 (Cólon)	HL60 (Leucemia)
Extrato	>100	>100	>100	65,77 (58,07 - 74,49)
F1 (Extrato+emulsão)	77,40 (68,32 -87,67)	85,84 (61,93 - 119)	>100	17,34 (11,95 - 25,17)
Emulsão	85,59 (69,12 - 106)	70,02 (61,40 - 79,86)	>100	14,86 (11,28 - 19,56)
Doxorrubicina^a	0,44 (0,34-0,54)	1,20 (1,03-1,39)	0,11 (0,08-0,14)	0,01 (0,005-0,01)

Fonte: Elaborada pela autora.

*Valores de concentração inibitória média (IC₅₀) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear. ^aDoxorrubicina foi usada como controle positivo.

Verificou-se que a emulsão sem a presença do composto ativo (extrato aquoso de PN) apresentou inibição do crescimento celular com IC₅₀ 14,86 µg/mL frente à linhagem leucêmica, e percentuais equivalentes à formulação F1 nas demais linhagens. A emulsão apresentou citotoxicidade maior que o extrato testado separadamente frente à linhagem HL60.

Isto pode ter acontecido devido a características dos componentes básico da emulsão. Os tensoativos tem porcentagem de 10% da massa da emulsão e 5% de óleo de girassol. Os tensoativos são sabões usados para diminuir a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, eles podem estar causando a ruptura da parede celular das células. Como as membranas plasmática e nuclear são compostas principalmente por lipídios, as moléculas de detergente as desestruturam e provocam a sua ruptura (LODISH, 2002).

Ooi *et al.* (2015), estudaram a atividade da filantina, um composto extraído da *Phyllanthus niruri* contra o carcinoma hepático humano de células HepG2 e concluíram que a citotoxicidade depende da concentração e do tempo de exposição das células frente ao ativo.

Parvathaneni *et al.* (2014), também observou o mesmo quando estudos *in vitro* demonstraram um efeito inibitório no crescimento celular para linhas celulares de câncer de mama depende da dose dos ativos. Conclui-se que a associação dos componentes carreadores da emulsão deve apresentar sinergismo, promovendo assim, a citotoxicidade frente as

linhagens tumorais. Com isto, deve-se realizar novos testes para avaliar as proporções utilizadas na emulsão.

5.5.5 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método ABTS⁺

O valor da atividade antioxidante é expresso em μM trolox/g de extrato utilizado. A absorbância para 1000 μM trolox foi igual a 0,4374, calculada pela equação da reta $y = -0,0003x + 0,7374$. A equação da reta para a amostra da emulsão foi de $y = 5\text{E}^{-06}x + 0,3813$ e o valor de trolox calculado foi de $89,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$ trolox/g.

Este valor é mais baixo que o valor apresentado pelo extrato bruto, porém bastante alto, esta diferença se deve pelas concentrações utilizadas do extrato e da emulsão que não foram as mesmas. Foi observada alta atividade antioxidante do extrato, e o mesmo foi diluído em proporção de 1:5 para a análise ser realizada e a leitura ser feita entre os valores da curva padrão. A amostra da emulsão tem uma concentração de 100 μL em aproximadamente 20 mL de formulação.

6 CONCLUSÃO

Obteve-se colágeno extraído de escamas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com alto grau de pureza. Com a caracterização do colágeno observou-se que este apresentou morfologia adequada e superfície livre de impurezas e ainda que sua estrutura química foi mantida durante a extração, apresentando bandas de absorção no espectro de infravermelho características da proteína. Observou-se também que a integridade da tripla hélice foi preservada, excluindo-se a possibilidade de desnaturação da proteína, que teve seu início de desnaturação em torno de 30°C.

Obteve-se também o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e sua classificação quanto as moléculas que o compõem e sua atividade antioxidante de 42,72 µg/ml e atividade citotóxica de 65,77 (58,07 - 74,49) para linhas tumorais de leucemia.

O início do desenvolvimento das emulsões foi realizado, elucidando a concentração dos componentes base das mesmas e sua estabilidade, além do EHL requerido para o óleo de girassol igual a 7,0.

Testes com emulsões adicionadas de colágeno foram realizados e suas características estudadas. Após a adição do extrato observou a mudança em todas propriedades da emulsão, então medidas foram tomadas para tentar inibir essa alteração devido a diferença gama de grupos funcionais presentes no extrato.

A nova emulsão formada (F'1) apresentou pH de 4,73, condutividade de 149,62 µS/cm, tamanho de glóbulos de 281,2, potencial zeta de -31,2 e pDI de 0,396, características bem melhores do que as das outras formulações.

Nos testes *in vitro* de atividade citotóxica, observou-se atividade no branco e na formulação com extrato. Os valores de IC₅₀ foram próximos então concluiu-se que existe sinergismo entre os componentes e estudos com diferentes concentrações precisa ser feito, ou até mesmo mudança do par de tensoativos.

REFERÊNCIAS

- ABLA, M. J.; BANGA, A K. Formulation of tocopherol nanocarriers and in vitro delivery into human skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 3, p. 239–46, 2014.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 817-824, 2010.
- ALVES, N.C.. Penetração de Ativos na Pele: Revisão Bibliográfica. **Amazônia Science & Health**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.36-43, 10 dez. 2015.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, 2004.
- A AMIN, Zahra et al. Assessment of In vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.1874-1877, 9 jan. 2012.
- ANVISA. **QUEBRA-PEDRA *Phyllanthus niruri* herbae**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp_240509/quebra-pedra_niruri_final_.pdf>. Acesso em: 29 maio 2018.
- ARAB, Danial; KANTZAS, Apostolos; BRYANT, Steven L.. Nanoparticle stabilized oil in water emulsions: A critical review. **Journal Of Petroleum Science And Engineering**, [s.l.], v. 163, p.217-242, abr. 2018.
- ARANCIBIA, C. et al. Application of CMC as Thickener on Nanoemulsions Based on Olive Oil: Physical Properties and Stability. **International Journal Of Polymer Science**, [s.l.], v. 2016, p.1-10, 2016.
- ASSIS, Letícia Marques de et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.99-109, jun. 2012.
- ATAYDE, Sandra Aparecida. **Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes mellitus**. 2011. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- AULTON, M. E.; **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2ª Edição. Artmed Editora, 2005.
- BABU, R. I., & GANESH, K. N. Enhanced triple helix stability of collagen peptides with 4R-Aminopropyl (Amp) residues: Relative roles of electrostatic and hydrogen bonding effects. **Journal of American Chemical Society**, v.123, p.2079–2080, 2001.
- BECK, Ruy; GUTERRES, Silvia; POHLMANN, Adriana. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. Porto Alegre: Springer, 2011.p. 380.

BHAGWAT, Prashant K.; DANDGE, Padma B.. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 15, p.43-55, jul. 2018.

CHANDER, R.; RIZVI, F.; KHANNA, A.K.. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**. India, p. 19-22. maio 2002.

CHEN, Junde et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 66, p.453-459, mar. 2016.

CHUAYCHAN, Sira; BENJAKUL, Soottawat; KISHIMURA, Hideki. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.71-76, set. 2015.

CLARES, B.; CALPENA, A. C.; PARRA, A. et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 591–598, 2014.

DRAPALA, Kamil P.; MULVIHILL, Daniel M.; O'MAHONY, James A.. A review of the analytical approaches used for studying the structure, interactions and stability of emulsions in nutritional beverage systems. **Food Structure**, [s.l.], v. 16, p.27-42, abr. 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. pp. 200, 2016.

FELTES, Maria et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 14, p.669-677, jan. 2010.

FERNANDEZ, P.; ANDRE, V.; RIEGER, J.; KUHMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERREIRA, Tatiane da Silva; BARRETTO, Ana Lúcia Penna. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v.71, n.3, 2012.

FISHBASE. **Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)**. Disponível em: <<https://www.fishbase.de/summary/2#>>. Acesso em: 29 maio 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all**. Roma, 2016.

FRANZOL, Angélica; REZENDE, Mirabel Cerqueira. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, [s.l.], v. 25, n. , p.1-9, dez. 2015.

GELSE, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 55, n. 12, p.1531-1546, 28 nov. 2003. Elsevier BV.

GULLAPALLI, Rampurna P; SHETH, Bhogi B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.233-238, nov. 1999. Elsevier BV.

GUPTA, Ankur et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.2826-2841, 2016.

GUPTA, S. SEN; GHOSH, M. Formulation development and process parameter optimization of lipid nanoemulsions using an alginate-protein stabilizer. **Journal of Food Science and Technology**, 2014.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T.. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.180-185, mar. 2006. Elsevier BV.

HATANO, T., KAGAWA, H., YASUHARA T. , OKUDA, T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root; their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 2090-2097, 1988.

JAFERI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B.; Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1191-1202, 2008.

KADAM, A. N.; NAJLAH, M.; WAN, K.-W. et al. Stability of parenteral nanoemulsions loaded with paclitaxel: the influence of lipid phase composition, drug concentration and storage temperature. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 8, p. 999–1004, 2014.

KALE, Santosh Nemichand; DEORE, Sharada Laxman. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Systematic Reviews In Pharmacy**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.39-47, 19 nov. 2016. EManuscript Services.

KOMAIKO, Jennifer S.; MCCLEMENTS, David Julian. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.331-352, 8 jan. 2016.

KOZLOWSKA, J. et al. Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 81, p.220-227, nov. 2015.

KUBITZA, Fernando; CAMPOS, João Lorena. **O Aproveitamento dos subprodutos do processamento do pescado: A produção em laboratório**. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/94/SubProduto94.asp>>. Acesso em: 29 maio 2018.

KUMAR, Senthil; SHARMA, Anju; MAHADEVAN, N.. Nanotechnology: a promising approach for cosmetics. **International Journal Of Recent Advances In Pharmaceutical Research**. Sirsa, p. 54-61. abr. 2012

LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nano suspension technology : a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** , v. 2, 2010.

LEE, Sau H. et al. Suppression of ERK1/2 and hypoxia pathways by four *Phyllanthus* species inhibits metastasis of human breast cancer cells. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.855-865, out. 2016. Elsevier BV.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. 2ª Ed. São Paulo: Santa Isabel; 2008.

LIU, Dasong et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 133, n. 4, p.1441-1448, ago. 2012. Elsevier BV.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSHY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. e DARNELL, J. **Biologia celular e molecular**. 4a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

MADAAN, Vani et al. EMULSION TECHNOLOGY AND RECENT TRENDS IN EMULSION APPLICATIONS. **International Research Journal Of Pharmacy**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.533-542, 5 ago. 2014.

MADAAN, Vani et al. EMULSION TECHNOLOGY AND RECENT TRENDS IN EMULSION APPLICATIONS. **International Research Journal Of Pharmacy**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.533-542, 5 ago. 2014. Moksha Publishing House.

MARTINS, Maria Emanuella de Oliveira et al. **Obtenção de Gelatina a partir de Escama de Tilápia (*Oreochromis niloticus*): Características Químicas e Físico-químicas**. 2015. Disponível em: <www.cnpma.embrapa.br>. Acesso em: 08 jul. 2017.

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

MASON, T G et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal Of Physics: Condensed Matter**, [s.l.], v. 18, n. 41, p.635-666, 29 set. 2006. IOP Publishing.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1719-1729, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 251, p.55-79, jan. 2018.

MEDIANI, Ahmed et al. Characterization of Metabolite Profile in *Phyllanthus niruri* and Correlation with Bioactivity Elucidated by Nuclear Magnetic Resonance Based Metabolomics. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.902-913, 30 maio 2017.

MICHALUN, Natalia; MICHALUN, Varinia. **Milady's SKIN CARE AND COSMETIC INGREDIENTS DICTIONARY**. New York: Cengage Learning, 2010.

MILLER, D. J.; HENNING, T.; GRUNBEIN, W. Coloids Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects, v. 183-185, p. 681-688, 2001.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A.; Physicochemical characterization of canola oil/water nanoemulsion obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, p 109-115, 2006.

MOSTOFA, Ronia et al. Evaluation of anti-inflammatory and gastric anti-ulcer activity of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves in experimental rats. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-10, 16 maio 2017.

NASCIMENTO, João Eudes do. **Estudo comparativo de três espécies de Phyllanthus conhecidas como quebra-pedra**.2008. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

NAVARRO, Mirtha et al. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd.. **Plants**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.50-60, 19 out. 2017.

NISHIURA, J. L. et al. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. **Urological Research**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.362-366, 19 jun. 2004.

NOGUEIRA, Luiz Augusto Horta; CAPAZ, Rafael Silva. **Ciências ambientais para engenharia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. NOGUEIRA, Luiz Augusto Horta; CAPAZ, Rafael Silva. **Ciências ambientais para engenharia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

OETTERER, Marília; BORGHESI, Ricardo; FERRAZ, Lia. **Aproveitamento de resíduos reduz desperdícios e poluição ambiental**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va11-sustentabilidade01.pdf>. Acesso em: 29 maio 2018.

OLIVEIRA, Marcos de. Tilapia's turn: Studies on Brazil's most abundant fish have resulted in a new variety, a vaccine and probiotics, in addition to genetic selection. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, v. -, n. 249, p.67-71, nov. 2016.

OOI, Kheng Leong et al. Cytotoxic, caspase-3 induction and in vivo hepatoprotective effects of phyllanthin, a major constituent of *Phyllanthus niruri*. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 14, p.236-243, abr. 2015.

PANT, Shailaja. A review on emulgel novel approach for topical drug delivery system. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Uttarakhand, v. 10, n. 4, p.1728-1743, ago. 2015.

PENNA, Ana Lúcia Barretto; SILVA, Tatiane Ferreira da. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, São Paulo, v. 3, n. 71, p.530-539,

abr. 2012.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PEREIRA, Luciano José Barreto; GARCIA-ROJAS, Edwin Elard. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.155-162, jan. 2015.

PUCCI et al. Effect of phyllanthus niruri on metabolic parameters of patients with kidney stone: a perspective for disease prevention. **International Brazilian Journal Of Urology**, São Paulo, v. 44, n. 10, p.1-10, mar. 2018.

SABIR, S.m.; ROCHA, J.b.t.. Water-extractable phytochemicals from Phyllanthus niruri exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 111, n. 4, p.845-851, 15 dez. 2008.

SALAGER, J. L.; MARQUÉZ, L.; PENA, A.; RONDÓ, M.; SULVA, F.; TYRODE, E. Current Phenomenological know-how and modeling of emulsion inversion. **Industry and Engineering Chemical Research**, v. 39, p. 2665-2676, 2000.

SATAPATHY, Sitipragyan et al. Development and characterization of gelatin-based hydrogels, emulsion hydrogels, and bigels: A comparative study. **Journal Of Applied Polymer Science**, [s.l.], v. 132, n. 8, p.41502-41514, 7 out. 2014.

SHAIK, Shaheda Sultana et al. Emulgel – a novel surrogate approach for transdermal drug delivery system. **Indo American Journal Of Pharmaceutical Research**, Andhra Pradesh, v. 4, n. 11, p.5250-5265, nov. 2014.

SILVA, José Dilson F. da et al. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, [s.l.], p.1196-1206, 2015.

SINGH, P.; BENJAKUL, S.; MAQSOOD, S.; KISHIMURA, H. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124, p. 97–105, 2011.

SINGH, Vishal. NANOEMULSIFICATION - A NOVEL TARGETED DRUG DELIVERY TOOL. **Journal Of Drug Delivery & Therapeutics**. Mohali, p. 40-45. jun. 2012.

SIQUEIRA, João Máximo de. **O quebra-pedra e suas propriedades medicinais**. 2012. Disponível em: <<http://www.ufsj.edu.br>>. Acesso em: 08 jul. 2017

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCOA-CELMA, MJ. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.10, n. 3-4, p 102-110, 2005.

SOUSA FILHO, Paulo C. de; SERRA, Osvaldo A.. Metodologias de síntese em fase líquida

para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Química Nova**, São Paulo, v. 00, n. 10, p.1-17, abr. 2015.

SOUSA, Adriana Dutra. **Efeito do método de extração e da secagem sobre o conteúdo fenólico e a composição química de quebra-pedra**. 2017. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SOUZA, V.M. **Ativos dermatológicos**. São Paulo: Tecnopress; v. 1, p.214, 2003.

TADROS, Tharwat F.. Emulsion Science and Technology: A General Introduction. **Emulsion Science And Technology**, [s.l.], p.1-56, jun. 2009.

TAGNE, Jean-bosco; KAKUMANU, Srikanth; NICOLOSI, Robert J.. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.1055-1063, dez. 2008.).

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2014.

THADRO, T; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, P.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advanced in colloid and interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TRAN, T. H.; GUO, Y.; SONG, D.; BRUNO, R. S.; LU, X. Quercetin-containing selfnanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 3, p. 840–52, 2014.

UFRJ, Museu Nacional. **Oreochromis niloticus**. Disponível em: <[http://museunacional.ufrj.br/hortobotanico/Peixes/Oreochromis niloticus.html](http://museunacional.ufrj.br/hortobotanico/Peixes/Oreochromis_niloticus.html)>. Acesso em: 29 maio 2018.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708-716, 2015.

VICENTE, Igor S. T.; ELIAS, Fabiana; FONSECA-ALVES, Carlos E.. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, São Paulo, v. 4, n. 37, p.392-398, set. 2014.

WANG M.X, CHENG H.W, LI Y.J, MENG L.M.. **Efficacy of *Phyllanthus* species in treating patients with chronic Hepatitis B** Zhongguo Zhong Yaoza Zhi, v. 19, n. 12, p. 750-764, 1994.

WONG, S.f.; LIM, J.s.; DOL, S.s.. Crude oil emulsion: A review on formation, classification and stability of water-in-oil emulsions. **Journal Of Petroleum Science And Engineering**, [s.l.], v. 135, p.498-504, nov. 2015.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a

review. **International Journal Of Cosmetic Science**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.13-24, 28 jul. 2015. Wiley-Blackwell.

ZEEB, B.; HERZ, E.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Impact of alcohols on the formation and stability of protein-stabilized nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 433C, p. 196–203, 2014.

ZEEB, Benjamin et al. Reprint of: Impact of alcohols on the formation and stability of protein-stabilized nanoemulsions. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 449, p.13-20, jul. 2015. Elsevier BV.

ZHANG, Y., LIU, W. T., LI, G. Y., SHI, B., MIAO, Y. Q., & WU, X. H. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v. 103, p. 906–912, 2007.

**APÊNDICE A – COMPOSTOS DETERMINADOS POR UPLC-QTOF-MS / MS NO
EXTRATO AQUOSO DE *Phyllanthus niruri***

N	T_r	-H⁻	Fragmento	Fórmula molecular	Calculado	Erro	Composto	Referência
1	0,86	209,0296	191,0211	C ₆ H ₁₀ O ₈	209,0297	-1,0	Ácido Mucico	Yang et al. (2012)
2	0,92	191,0533	127,0433	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0556	-2,3	Ácido Quínico	Kumar et al. (2015)
3	1,23	355,0337	337,0178 711,0754	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	355,0301	3,6	Ácido Chebúlico	Yang et al. (2012)
4	1,60	331,0672	271,0437 169,0112	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0665	2,1	Monogaloil hexosídeo	-
5	1,78	169,0125	125,0244	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	-7,1	Ácido Gálico	Yang et al. (2012)
6	2,39	447,1110	301,0053 337,0171 435,0689	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	447,1139	-6,5	Desconhecido	-
7	2,65	649,0686	169,0137 300,9996 435,0585	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	649,0677	1,8	Furosina	Lai et al. (2013)
8	2,88	649,0740	169,0143 300,9988 435,0587	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉ isomer	649,0677	4,7	Furosina Isômero	Lai et al. (2013)
9	3,07	969,0886	169,0130 247,0241 300,9972 337,0155	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₈	969,0845	4,2	Ácido Repandusínico A	Ogata et al. (1992)
10	3,15	291,0139	191,0337 247,0240 273,0041	C ₁₃ H ₇ O ₈	291,0141	0,7	Ácido Carboxílico Brevifolina	Kumar et al. (2015)
11	3,33	951,0721	169,0153 301,0002 933,0685	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951,0740	-2,0	Geraniina	Kumar et al. (2015)
12	3,34	633,0687	300,9998 463,0565	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633,0728	-6,5	Corilagina	Kumar et al. (2015)
13	3,54	387,1660	169,0153 207,033 329,0911	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	387,1655	,3	Ácido Tuberônico Hexosídeo	Kumar et al. (2015)
14	3,60	925,0967	301,0015	C ₄₀ H ₃₀ O ₂₆	925,0947	,2	Phyllanthusina C	Latté and Kolodziej (2000)
15	3,66	969,0811	169,0138 240,247 300,9992	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₈	969,0845	3,3	Ácido Repandusínico A (isômero)	Ogata et al. (1992)
16	3,81	593,1469	429,0845 473,1122	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1506	-6,2	Orientin-2''-O-ramnosídeo	Sun et al. (2013); Sprenger et al. (2013)

N	T _r	-H ⁻	Fragmento	Fórmula molecular	Calculado	Erro	Composto	Referência
17	3,92	951,0731	169,0131 300,9971 363,0742	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951,0740	-0,9	Geraniina (isômero)	Kumar et al. (2015)
18	4,10	577,1483	300,9975 413,0865	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577,1557	-4,8	Vitexin-2''-O- ramnosídeo	Sun et al. (2013); Sprenger et al. (2013)
19	4,21	436,0853	301,9946 463,1061	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0877	-5,2	Quercentina-3- O-hexosídeo	Hossain et al. (2010)
20	4,73	447,0909	300,0265 301,0241	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0927	-4,0	-	
21	4,86	923,0831	300,9988 327,0539 431,0993	C ₄₀ H ₂₈ O ₂₆	923,0791	4,3	Phyllanthusina U	Chen et al. (2011)
22	5,28	583,1066	169,0124 395,0763 413,0885	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	583,1088	-3,8	Kaempferol-O- galoil- deoxyhexosídeo	Gu et al. (2013)
23	5,56	559,1479	395,0776 483,1919	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	559,1452	4,8	Ácido 3-O- Sinapoil-5-O- cafeoilquinico	Kuhnert et al. (2011)