UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação de micro e nanopartículas contendo óleo de
café verde para aplicações dermocosméticas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Anna Beatriz Frejuello Limoli Nosari

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio César Gozzo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/12/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação de micro e nanopartículas contendo óleo de
café verde para aplicações dermocosméticas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Ribeirão Preto – SP

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO. PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nosari, Anna Beatriz Frejuello Limoli

Desenvolvimento e avaliação de micro e nanopartículas contendo óleo de café verde para aplicações dermocosméticas.

142 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

Co-Orientador: Gozzo, Fábio César

1. Óleo de café verde
2. Micropartículas lipídicas sólidas
3. Nanopartículas lipídicas sólidas
3. Estabilidade
4. Hidratação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anna Beatriz Frejuello Limoli Nosari

Desenvolvimento e avaliação de micro e nanopartículas contendo óleo de café verde para aplicações dermocosméticas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas
Co-Orientador: Fábio César Gozzo

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais **Taymir** e **Ana Maria** por me ensinarem a ser uma pessoa honesta, digna, por acreditarem em mim e acima de tudo, por me amarem incondicionalmente.*

*À minha pequena **Giulia**, que me ensina a cada dia que a felicidade mora em pequenos gestos e por ter me ensinada o que é amor infinito.*

*Ao meu marido **Samuel** pelo amor, compreensão e companheirismo.*

*Aos meus irmãos **Veridiana**, **Christiano** e **Anna Carolina** por existirem e tornarem a minha vida mais feliz.*

Agradecimientos

À Deus por me abençoar a cada dia e estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais Taymir e Ana Maria e aos meus irmãos Veridiana, Christiano e Anna Carolina por estarem sempre por perto me apoiando e incentivando. Agradeço por fazer parte desta grande família.

Ao meu marido Samuel por todo amor e dedicação. Obrigada por estar ao meu lado e por ter me dado o meu maior presente, nossa pequena Giulia.

À Andrelina Pacífico por sua amizade e principalmente por todo carinho, amor e dedicação à minha filha.

Ao meu orientador Luis Alexandre Pedro de Freitas por acreditar em mim, pelos tantos ensinamentos durante esses anos, pela dedicação e acima de tudo por toda a sua paciência e compreensão. Sou muito grata pela oportunidade concedida.

Ao meu co-orientador Fábio César Gozzo do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, por abrir o seu laboratório para mim e pela oportunidade de fazermos esta parceria com a UNICAMP.

Aos meus amigos do Laboratório de Física Industrial: Áurea, Ana Rita, Cristiane, Marcela, Raíssa, Simone, Tatiana e Thiago pela amizade, conversas e ensinamentos. Em especial, agradeço imensamente minha amiga Cristina Zamarioli pela grande ajuda nos testes de permeação, não teria conseguido sem você.

À Priscila, técnica do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP, por toda a sua ajuda, paciência e dedicação. Muito obrigada por sempre estar pronta para ajudar quem precisa.

À Tatiana Brenelli de Lima do Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP, por toda sua amizade, dedicação, gentileza e prontidão em me auxiliar as inúmeras vezes que precisei.

Ao técnico Luiz Henrique Cenzi por me ajudar no processo de produção das micropartículas e por sua amizade.

Aos técnicos de laboratório José Orestes, Henrique e Rodrigo por toda ajuda e paciência

À Professora Kamilla Swiech e seu aluno Robson Luis Ferraz do Amaral, por todo apoio, ensinamento, dedicação e parceria nos estudos de viabilidade celular.

Ao Professor André Rolim Baby e sua aluna Thalita Marcilio Candido, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP-SP), por todo apoio e prontidão em nos ajudar na realização dos testes de avaliação do fator de proteção solar.

A Professora Patrícia M. B. G. Maia Campos e sua aluna Maisa, por nos dar a oportunidade de realizarmos os testes clínicos iniciais. Esses estudos iniciais foram indispensáveis para o fechamento deste trabalho.

Aos funcionários da seção de Pós Graduação da FCFRP-USP, em especial a Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi pela dedicação, assistência e eficiência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2012/04071-7) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito, muito obrigada!

*“It's not always easy and sometimes life can be deceiving
I'll tell you one thing
it's always better when we're together”*

*Better Together - **Jack Johnson***

Resumo

NOSARI, A.B.F.L. **Desenvolvimento e avaliação de micro e nanopartículas contendo óleo de café verde para aplicações dermocosméticas.** 2015. 142f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar a eficácia de micro e nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de café verde, cera de abelha e alfa-tocoferol. O óleo de café verde (OCV) foi quantificado por cromatografia gasosa, apresentando em sua composição ácido palmítico (28,74%), ácido linoléico (42,77%), ácido oleico (12,51%), ácido esteárico (10,62%), ácido araquídico (3,57%) entre outros ácidos graxos (1,79%), estes valores foram próximos àqueles descrito na literatura. As micropartículas foram preparadas pelo método de spray congealing e as nanopartículas pela técnica da microemulsão a quente. Os rendimentos de micropartículas variaram de 42 a 58% com tamanhos entre 63,3 a 101,2 μm . Os rendimentos das nanopartículas variaram entre 96 a 97% e com tamanhos entre 249 a 766 nm. Posteriormente foram definidas as condições para o processo de produção das micro e nanopartículas, bem como a concentração de OCV, alfa tocoferol e cera de abelha (CA). Um estudo mais detalhado das proporções de OCV, cera de abelha e alfatocoferol foi realizado com o auxílio de um planejamento de misturas, avaliando a estabilidade oxidativa por testes Rancimat e Termogravimétricos. Porém, nas condições do presente estudo, esses resultados não foram estatisticamente diferentes, por isso escolheu-se a maior concentração de OCV proposta (50%). Após estas etapas, as partículas foram adicionadas em gel aristoflex[®], bem como o OCV em sua forma líquida, formando três géis de mesma concentração para comparar e avaliar a viabilidade do preparo de micro e nanopartículas frente a forma convencional já comercializada. Estudos em *Artemia salina* foram realizados como teste preliminar para avaliar a citotoxicidade dos três géis, sendo que em concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ os géis contendo nanopartículas apresentaram maior letalidade do que aqueles compostos por micropartículas ou OCV líquido. Testes de FPS *in vitro* apresentaram baixos índices de proteção solar, entre 0,19 e 0,28, porém o OCV apresenta proteção contra os raios UVB podendo ser utilizado como potencializador na ação fotoprotetora de filtros químicos. As análises de viabilidade celular mostraram que mesmo na forma de micro ou nanopartículas, o OCV e a cera de abelhas se mantiveram seguros para a utilização em formulações tópicas. Nos testes de estabilidade química, transcorrido o tempo de armazenamento, os géis contendo OCV em sua forma líquida apresentaram teores de ácido palmítico de 56 e 38%, nas temperaturas de 25°C e 40°C respectivamente. Enquanto que as micropartículas apresentaram teores de 69 e 53% e as nanopartículas 73 e 69%, nas referidas temperaturas. Nos testes clínicos, as micropartículas apresentaram um melhor desempenho para a melhora do conteúdo aquoso do estrato córneo depois de 2 horas de aplicação do produto. Já as nanopartículas apresentaram os melhores resultados para a perda de água transepidérmica, conferindo à pele uma menor perda de água. Nos testes de permeação cutânea, não houve quantificação pelo método utilizado em nenhum tempo da fase receptora, porém o presente estudos apresentou maiores concentrações do ácido palmítico na derme dos ensaios feitos para as nanopartículas e no estrato córneo daqueles feitos para as micropartículas. Portanto, diante dos resultados obtidos, a micro e nanoencapsulação do OCV é uma alternativa interessante para aumentar a estabilidade deste óleo, além de promover melhoras em sua eficácia.

Palavras-chave: óleo de café verde; micropartículas; nanopartículas; estabilidade.

Abstract

NOSARI, A.B.F.L. **Development and evaluation of micro and nanoparticles containing green coffee oil for dermocosmetic applications.** 2015. 142f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

This study aimed to develop and assess the effectiveness of solid lipid micro and nanoparticles containing green coffee oil, beeswax and alpha-tocopherol. Green coffee oil was quantified by gas chromatography, showing the composition in their palmitic acid (28.74%), linoleic acid (42.77%), oleic acid (12.51%), stearic acid (10.62%), arachidic acid (3.57%) and other fatty acids (1.79%), these values were similar to those described in the literature. The microparticles were prepared by spray congealing method, and the nanoparticles by the technique of hot microemulsion. Microparticles yields ranged 42-58% in size from 63.3 to 101.2 micrometers. Yields of nanoparticles ranged from 96-97% and ranging in size from 249-766 nm. Thereafter the conditions were set for the process of production of micro and nanoparticles, as well as the concentration of green coffee oil, alpha tocopherol and beeswax. A more detailed study of the proportions of GCO, beeswax and alpha-tocopherol was performed with the aid of a planning mixtures evaluating the oxidative stability by Rancimat and thermogravimetric tests. However, under the conditions of this study, these results were not statistically different, so it was chosen the highest concentration of green coffee oil proposal (50%). After these steps, the particles were added in aristoflex® gel, and the green coffee oil in liquid form, forming three gels of the same concentration to compare and assess the viability of micro and nanoparticles prepared against conventionally already commercialized. Studies were conducted on *Artemia salina* as a preliminary test to evaluate the cytotoxicity of the three gels, whereas at concentrations of 500µg/ml nanoparticles containing gels had a higher mortality than those composed of microparticles or liquid GCO. SPF vitro tests showed low levels of sunscreen, between 0.19 and 0.28, but GCO shows protection against UVB rays can be used as potentiating the action of chemical sunscreen filters. The cell viability tests have shown that even in the form of microparticles or nanoparticles, the GCO and beeswax kept safe for use in topical formulations. In the chemical stability test, the elapsed storage time, the gels containing GCO presented in liquid form palmitic acid levels of 56 and 38% at temperatures of 25°C and 40°C respectively. While the microparticles showed levels of 69 and 53% and the nanoparticles 73 and 69% in those temperatures. In clinical tests, the microparticles showed a better performance for the improvement of the water content of the stratum corneum after 2 hours of application of the product. Already nanoparticles showed the best results for the transepidermal water loss, giving the skin a smaller loss water. The skin permeation tests, no quantification by the method used at any time from the receiving phase, but this study showed higher concentrations of palmitic acid in the dermis of the tests made to the nanoparticles and the stratum corneum of those made to the microparticles. Therefore, opposite the results obtained, the micro and nanoencapsulção of green coffee oil is an interesting alternative to increase the stability of this oil, and promote improvements in their effectiveness.

Key-words: green coffee oil; microparticles; nanoparticles, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Crescimento da Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos nos últimos 19 anos, segundo ABIHPEC.....	27
Figura 2.	Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2003.....	34
Figura 3.	Esquema das adaptações feitas no <i>spray dryer</i> para o uso da técnica de <i>spray congealing</i>	36
Figura 4.	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	38
Figura 5.	Imagem representativa das camadas e estruturas da pele.....	39
Figura 6.	Vias da permeação cutânea de ativos.....	40
Figura 7.	Gráfico de um planejamento experimental com misturas.....	42
Figura 8.	Célula de difusão de Franz.....	50
Figura 9.	Técnica de <i>tape stripping</i> . Figura adaptada de ANROOP <i>et al</i> , 2013.	51
Figura 10.	Posições no antebraço onde foram aplicadas as formulações e realizadas as medições para ensaios clínicos.....	75
Figura 11.	Cromatograma do óleo de café verde. Onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem respectivamente aos ácidos palmítico, linoleico, oleico, esteárico e araquídico.....	78
Figura 12.	Comparação entre os espectros de massa do pico 1 (ácido palmítico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	80
Figura 13.	Comparação entre os espectros de massa do pico 2 (ácido linoléico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	80
Figura 14.	Comparação entre os espectros de massa do pico 3 (ácido oleico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	81
Figura 15.	Comparação entre os espectros de massa do pico 4 (ácido esteárico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	81
Figura 16.	Comparação entre os espectros de massa do pico 5 (ácido araquídico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	81

Figura 17.	Cromatograma de alguns padrões de ácidos graxos. Onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem respectivamente aos ácidos mirístico, palmítico, esteárico, araquídico e beénico.....	82
Figura 18.	Comparação entre os espectros de massa do pico 1 (ácido mirístico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	82
Figura 19.	Comparação entre os espectros de massa do pico 2 (ácido palmítico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	83
Figura 20.	Comparação entre os espectros de massa do pico 3 (ácido esteárico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	83
Figura 21.	Comparação entre os espectros de massa do pico 4 (ácido araquídico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	83
Figura 22.	Comparação entre os espectros de massa do pico 5 (ácido beénico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca, respectivamente.....	84
Figura 23.	Curva analítica para o ácido palmítico.....	84
Figura 24.	Gráfico de densidade aparente das micropartículas.....	90
Figura 25.	Gráfico da densidade compactada das micropartículas.....	91
Figura 26.	Gráfico do teor de umidade das nanopartículas liofilizadas.....	91
Figura 27.	Gráfico de densidade compactada das nanopartículas liofilizadas.....	92
Figura 28.	Gráfico de viscosidade das nanopartículas liofilizadas.....	92
Figura 29.	Temperatura inicial de perda de massa nos estudos termogravimétricos das amostras feitas no planejamento com misturas.....	95
Figura 30.	Representação topográfica dos dados de estabilidade térmica oxidativa termogravimétricos no planejamento com misturas.....	96
Figura 31.	Resultados dos testes Rancimat modificados, usando como indicador a condutividade no meio receptor após 7h de experimento	99

Figura 32.	Fotografias das amostras dos géis contendo OCV em sua forma líquida, micropartículas e nanopartículas, separadamente, nos respectivos tempos pré determinados para o estudo de estabilidade física.....	102
Figura 33.	Viscosidade aparente dos três géis, nos tempos e temperaturas determinados para o estudo de estabilidade.....	104
Figura 34.	Comparação da variação das viscosidades nos respectivos tempos e temperaturas.....	105
Figura 35.	Representação da perda de massa em porcentagem dos três géis estudados, nos respectivos tempos e temperaturas.....	107
Figura 36.	Letalidade em <i>Artemia salina</i>	108
Figura 37.	Representação da viabilidade celular em diferentes concentrações dos três géis estudados.....	110
Figura 38.	Curvas de absorbâncias dos géis contendo micropartículas, nanopartículas ou OCV em sua forma líquida.....	112
Figura 39.	Gráfico com os valores obtidos para FPS nos três géis.....	113
Figura 40.	Comprimento de onda crítico apresentado para os três géis antes e depois de sofrerem irradiação.....	115
Figura 41.	Espectros de absorbância M-OCV.....	116
Figura 42.	Espectros de absorbância N-OCV.....	117
Figura 43.	Espectros de absorbância L-OCV.....	117
Figura 44.	FPS estimado para os três géis estudados.....	117
Figura 45.	Resultados obtidos pela quantificação de ácido palmítico presente nas amostras de estrato córneo por <i>tape stripping</i>	119
Figura 46.	Resultados obtidos pela quantificação de ácido palmítico presente nas amostras de derme e epiderme trituradas.....	120
Figura 47.	Conteúdo aquoso do estrato córneo de voluntárias (n=10) obtido para os três géis. Medidas feitas no ato da aplicação e depois de duas horas.....	122
Figura 48.	Perda de água trasepidérmica de voluntárias (n=10) obtido para os três géis. Medidas feitas no ato da aplicação e depois de duas horas.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variáveis codificadas e numéricas do planejamento experimental completo.....	60
Tabela 2.	Variáveis codificadas e numéricas do planejamento experimental saturado. Produção por ultra-turrax T-25 digital (IKA Works Inc, EUA).....	62
Tabela 3.	Variáveis codificadas e numéricas do planejamento experimental saturado. Produção por disruptor de células ultrassônico DES500 (Unique Ltda, Piracicaba, Brasil).....	62
Tabela 4.	Quantidades de cada componente em suas respectivas fases, sendo um total de formulação igual a 200g	62
Tabela 5.	Condições ideais escolhidas para a produção das micro e nanopartículas.....	64
Tabela 6.	Composição no preparo das amostras para a formação das micropartículas.....	64
Tabela 7.	Composição no preparo das amostras para a formação das nanopartículas.....	64
Tabela 8.	Porcentagem dos componentes da mistura em cada amostra do planejamento.....	67
Tabela 9.	Fator de multiplicação em seu respectivo comprimento de onda, segundo Mansur <i>et al.</i> , 1986.....	72
Tabela 10.	Principais ácidos graxos encontrados por cromatografia gasosa no óleo de café verde.....	79
Tabela 11.	Porcentagens descritas em literatura dos ácidos graxos presentes no OCV.....	79
Tabela 12.	Valores obtidos para o tamanho e rendimento das micropartículas....	85
Tabela 13.	Tamanho das nanopartículas obtidas por homogeneização em ultra-turrax.....	86
Tabela 14.	Tamanho das nanopartículas obtidas por homogeneização em ultrassom.....	87
Tabela 15.	Planejamento experimental e o tamanho das partículas obtidas em cada ensaio.....	88

Tabela 16.	Tamanho das nanopartículas produzidas seguindo as condições de ensaio T2.....	88
Tabela 17.	Resultados da caracterização das micropartículas.....	89
Tabela 18.	Resultados da caracterização das nanopartículas.....	90
Tabela 19.	Resultados para os testes de estabilidade oxidativa.....	96
Tabela 20.	Condições do processo para a produção das micro e nanopartículas	100
Tabela 21.	Tamanho das partículas e eficiência de encapsulação nos estudos de reprodutibilidade do processo.....	100
Tabela 22.	Tamanho das micro e nanopartículas após incorporação no gel.....	101
Tabela 23.	Tratamento estatístico para realizado para M-OCV nos ensaios de viscosidade.....	105
Tabela 24.	Valores em porcentagem da perda de ácido palmítico ao longo do estudo de estabilidade.....	106
Tabela 25.	Tratamento estatístico para Letalidade em <i>Artemia Salina</i> para os géis M-OCV, N-OCV e L-OCV.....	109
Tabela 26.	Porcentagem de células vivas após ensaio XTT.....	110
Tabela 27.	Tratamento estatístico realizado para os testes de viabilidade celular (gel M-OCV).....	111
Tabela 28.	Tratamento estatístico realizado para os testes de viabilidade celular (gel L-OCV).....	111
Tabela 29.	Tratamento estatístico para os FPSs encontrados pelo método espectrofotométrico.....	113
Tabela 30.	Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos de comprimento de onda no Labsphere [®] , para as amostras pré e pós irradiadas.....	115
Tabela 31.	Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos de comprimento de onda no Labsphere [®] , para as amostras pós irradiadas.....	116
Tabela 32.	Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos na determinação da quantidade de OCV presente nas amostras de estrato córneo retiradas por <i>tape stripping</i>	120

Tabela 33.	Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos na determinação da quantidade de OCV presente nas amostras de derme e epiderme triturados.....	121
Tabela 34.	Resultado da aplicação do Teste de Wilcoxon Pareado para os valores obtidos na determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo com as formulações contendo micropartículas.....	123
Tabela 35.	Resultado da aplicação do Teste de Wilcoxon Pareado para os valores obtidos na determinação da perda de água transepidérmica com as formulações contendo nanopartículas.....	124

LISTA DE SIGLAS

aa	Ano a ano
ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
Abs	Absorbância
AcP	Ácido palmítico
AGs	Ácidos Graxos
α -toc	Acetato de alfa-tocoferol
°C	Graus Celsius
CA	Cera de abelha
CG	Cromatografia Gasosa
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
DA	Densidade aparente
DC	Densidade compactada
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Caloria Exploratória Diferencial
Exp	Experimento
FPS	Fator de Proteção Solar
g	Grama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
L-OCV	Gel hidrofílico contendo OCV em sua forma líquida
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
m ³	Metro cúbico
mg	Miligrama
min	Minuto
MLSs	Micropartículas lipídicas sólidas
mm	Milímetro
M-OCV	Gel hidrofílico produzido com as micropartículas contendo óleo de café verde

NLSs	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetro
N-OCV	Gel hidrofílico produzidos com as nanopartículas contendo óleo de café verde
OCV	Óleo de café verde
OCV- α	Óleo de Café verde associado ao alfa-tocoferol
P	Potência
qsp	Quantidade suficiente para
R	Rendimento
R ²	Coeficiente de linearidade
RMN-AR	Ressonância magnética nuclear de alta resolução
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
T	Temperatura
t	Tempo
Tam	Tamanho de partícula
TEWL	Transepidermal water loss
TGA	Análise Termogravimétrica
U	Umidade
UA	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V	Velocidade
VAR	Vazão do ar de resfriamento
VC	Variáveis codificadas
VD	Vazão de dispersão
Visc	Viscosidade
XTT	Hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1. O Óleo de Café Verde	31
2.2. Associação com α -tocoferol	33
2.3. Técnicas de Produção de Micro e Nanoestruturas Contendo Lipídios	33
2.4. Tamanho de partículas e a pele	39
2.5. Planejamento Experimental.....	41
2.5.1. Planejamento com misturas	42
2.6. Análises Calorimétricas	43
2.7. Estudos de estabilidade físico-química	45
2.8. Ensaios de toxicidade e citotoxicidade	46
2.9. Avaliação do potencial fotoprotetor	47
2.10. Permeação Cutânea.....	49
2.11. Ensaios clínicos.....	51
3. OBJETIVOS	55
3.1. Objetivo geral	55
3.2. Objetivos específicos.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1. Matérias-primas e reagentes.....	57
4.2. Equipamentos e acessórios	57
4.3. Métodos.....	58
4.3.1. Caracterização do óleo de café verde	58
4.3.2. Estudo do processo para o preparo das micro e nanopartículas	60
4.3.2.1. Micropartículas	60
4.3.2.2. Nanopartículas	61
4.3.3. Preparo dos sistemas micro e nanoparticulados, com diferentes concentrações de óleo de café verde.....	63
4.3.4. Caracterização dos sistemas para escolha das melhores condições.....	65
4.3.5. Estudo de estabilidade oxidativa em diferentes proporções dos componentes das micro e nanopartículas.....	66

4.3.6. Reprodutibilidade do processo	68
4.3.7. Preparação dos hidrogéis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV.....	68
4.3.8. Comparação entre os hidrogéis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV..	69
4.3.8.1. Estudo da Estabilidade Física	69
4.3.8.2. Estudo da Estabilidade Química.....	69
4.3.8.3. Letalidade em <i>Artemia salina</i>	70
4.3.8.4. Viabilidade Celular pelo Método XTT	70
4.3.8.5. Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> por espectrofotometria.....	71
4.3.8.6. Determinação Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere®)	72
4.3.8.7. Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	73
4.3.8.8. Avaliação clínica dos efeitos hidratantes das formulações.....	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1. Caracterização do óleo de café verde	78
5.2. Estudo do processo para o preparo das micro e nanopartículas contendo OCV.....	85
5.2.1. Micropartículas	85
5.2.2. Nanopartículas	86
5.3. Preparo e caracterização dos sistemas micro e nanoparticulados, com diferentes concentrações de óleo de café para escolha das melhores condições.	89
5.4. Estudo do planejamento com misturas.....	94
5.5. Reprodutibilidade do processo	99
5.6. Preparação das formulações: L-OCV, M-OCV e N-OCV.	100
5.7. Comparação entre os hidrogéis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV.....	102
5.7.1. Estudo da Estabilidade Física	102
5.7.2. Estudo da Estabilidade Química.....	105
5.7.3. Letalidade em <i>Artemia salina</i>	107
5.7.4. Viabilidade celular	109
5.7.5. Teste FPS <i>in vitro</i>	112
5.7.6. Teste FPS <i>in vitro</i> Labsphere	114
5.7.7. Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	119

5.7.8. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo	121
5.7.9. Determinação da perda transepidérmica de água	123
6. CONCLUSÕES	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Dentre as variáveis relacionadas ao desenvolvimento de uma sociedade, a tecnologia exerce um importante papel, estabelecendo a competitividade de um setor. A inovação passou a ser um importante diferencial para esta competitividade, uma vez que as empresas estão se nivelando quanto aos aspectos de qualidade e produtividade (AVELAR; SOUZA, 2006). A inovação tecnológica permite um aumento da eficiência de um processo produtivo ou o desenvolvimento de um produto novo ou aprimorado.

Inúmeros setores adotam estratégias tecnológicas para o desenvolvimento de novos produtos ou processos, dentre eles a indústria de cosméticos, setor em amplo crescimento. Desde tempos imemoriáveis os seres humanos fazem uso de produtos cosméticos, seja para perfumar, embelezar ou cuidar da pele. Porém foi o aumento da preocupação de mulheres e homens com a aparência que levou ao crescimento acentuado deste setor nos últimos anos. O maior cuidado com a pele, no intuito de corrigir imperfeições ou tentar prevenir ou retardar o aparecimento de sinais de envelhecimento, tornaram os cosméticos um investimento em qualidade de vida e bem estar, melhorando a autoestima. Com essa nova postura, o mercado de produtos cosméticos tem crescimento acentuado, pois fora estimado 7,4% para 2012, porém este foi de 15,7%, conforme Figura 1. (KUMAR, 2005; SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005; BRANDT; CAZZANIGA; HANN, 2011).

No Brasil, o crescimento da indústria de cosméticos também é marcante. Segundo o panorama anual publicado em 2015 pela Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) a Indústria Brasileira, neste segmento, apresentou nos últimos 19 anos um crescimento deflacionado próximo a 10% aa, conforme dados da Figura 1.

Figura 1. Crescimento da Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos nos últimos 19 anos, segundo a ABIHPEC.

O Brasil ocupa o primeiro lugar na América Latina no mercado consumidor de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos e o terceiro lugar no mercado mundial, perdendo apenas para Estados Unidos e China (ABIHPEC, 2015).

O crescimento deste setor e o aumento da competitividade exigem das empresas a busca constante por produtos inovadores ou a reformulações de embalagens e processos, incentivando a pesquisa e a formulação de produtos ou processos mais eficientes. Estes avanços permitem também o desenvolvimento de produtos mais estáveis, além de tornar possível a produção de novos sistemas de liberação. Dessa forma considera-se que o marco fundamental para este setor está centralizado em pesquisas feitas para o desenvolvimento de novos sistemas para a incorporação de ativos cosméticos (SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

Dentre os avanços tecnológicos existentes na área de cosméticos destaca-se uma tendência mundial que é a produção de sistemas micro e nanoparticulados. Segundo Marcato (2009) estes sistemas são investigados por apresentarem diversas vantagens com relação às formulações tradicionais, dentre elas: obter uma liberação modificada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar estabilidade físico-química de moléculas lábeis, diminuir a toxicidade entre outras.

Os sistemas micro e nanoestruturados vêm sendo amplamente estudados para a liberação de ativos através da pele, seja para obter efeitos locais ou sistêmicos (MARTINS, 2014; NOSARI, 2012; SILVA, *et al.*, 2014). A pele é o órgão integrante do sistema tegumentar que tem como principais funções a proteção dos tecidos subjacentes, regulação da temperatura, reserva de nutrientes e é nela que estão localizadas as terminações nervosas sensitivas. É o revestimento externo do corpo, considerado o maior órgão do corpo humano, atuando como uma barreira entre o organismo e o meio ambiente, protegendo contra os raios UV, danos físico-químicos e ataques microbiológicos (CONTRI, *et al.* 2011). Historicamente a pele tem sido utilizada para liberação tópica de ativos, porém em 1970, com o advento dos sistemas transdérmicos, esta passou a ser utilizada também como rota para a liberação sistêmica de ativos (ROY *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de nanopartículas pode ser considerado uma das tecnologias chaves do século XXI que abre novas perspectivas para o desenvolvimento de aplicações inovadoras (GUIMARÃES; RÉ, 2011). Dessa forma muitos estudos têm sido feitos com o uso de micro e nanopartículas para aplicação em cosméticos, porém a pele por ser o primeiro sistema de defesa do organismo, oferece muitas barreiras para penetração de ativos. A ciência de nanopartículas vem estudando os melhores sistemas para superar essas barreiras e assim atingir as camadas mais profundas (PROW *et al.*, 2011).

O uso das micro e nanoestruturas para o preparo de formulações cosméticas não se restringe apenas ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação, podendo ser utilizadas também para minimizar efeitos colaterais, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar estabilidade, diminuir a toxicidade ou proteger ativos contra a oxidação (CAO-HOANG, FOUGÈRE, WACHÉ, 2011; MARCATO, 2009; NOSARI, 2012). Substâncias oleosas líquidas também são microencapsuladas por matrizes que podem protegê-las contra a peroxidação lipídica que é a principal causa de deterioração dos materiais graxos (SILVA *et al.*, 1999). Um exemplo deste tipo de substância é o óleo de café verde, utilizado especialmente em produtos cosméticos. Este óleo tem efeito regenerativo e hidratante da pele, além de reduzir a celulite e auxiliar na proteção da pele contra os danos causados pelas radiações solares (PEREDA *et al.*, 2009; SPEER, KÖLLING-SPEER, 2006; WAGEMAKER *et al.*, 2011).

Para a obtenção desses sistemas micro e nanoestruturados podem ser utilizadas matrizes de origem natural, como por exemplo, as ceras naturais com diferentes graus de purificação ou ultra-refinação como a cera de abelha, cera de carnaúba, cera de cupuaçu, entre outras, ou podem ser sintéticas tais como polietilenoglicol, parafina, vaselina, Gelucires[®], monoestearato de glicerila, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, entre outras. Dentre as inúmeras matrizes que podem ser utilizadas para a produção dos sistemas micro e nanoestruturados destaca-se a cera de abelha purificada (CA), um produto de origem natural que apresenta características físico-químicas apropriadas para a produção das micro e nanoestruturas. Desta maneira, o presente trabalho visa utilizar sistemas micro e nanoestruturados contendo OCV e α -tocoferol (OCV- α), aplicando a CA purificada como carreador. Nos capítulos a seguir apresentam-se a revisão bibliográfica sobre o assunto, os materiais e os métodos utilizados, os resultados encontrados e as conclusões pertinentes.

Revisão
Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Óleo de Café Verde

O aumento da demanda por cosméticos naturais fez com que óleos e extratos vegetais fossem reintroduzidos no mercado de cosméticos, por suas ações emolientes e por apresentarem maior segurança (AHSHAWAT, *et al.* 2008).

Os óleos vegetais são amplamente utilizados na produção de cosméticos, dentre eles destaca-se o óleo de café verde (OCV), que é extraído das sementes do café (*Coffea arábica* L.). Trata-se de uma planta arbórea mundialmente conhecida por seus frutos elipsóides ou oblongos que fornecem uma das bebidas mais consumidas do mundo. A planta do café é um arbusto pequeno, atingindo cerca de 3 a 4 metros de altura e é encontrada nas regiões tropicais da América do Sul, Ásia e África. Pertence ao gênero *Coffea* e à família das Rubiáceas. Essa família abriga mais de 10 mil espécies, dentre elas, as duas com maior importância comercial são *Coffea arábica* Linn. e *Coffea canephora* Pierre, conhecidas respectivamente como arábica e robusta (LAGO, 2001).

O café apresenta uma das mais importantes mercadorias na economia global. Em uma colheita, os grãos considerados de alta qualidade são selecionados para a produção de bebidas, porém cerca de 15% deles apresentam baixa qualidade para fabricação de bebidas, o que desfavorece a renda do produtor. No entanto, esses grãos são fontes ricas de OCV, o qual é extraído por prensagem a frio e pode ser utilizado na produção de cosméticos e alimentos. Dessa forma, a utilização desses grãos dispensados para a produção de bebidas pode ser comercializado para a obtenção do OCV, aumentando o retorno econômico da produção e cultivo do café (CHIARI, *et al.* 2014).

O óleo extraído das sementes de grãos verdes ou imaturos de café vem sendo bastante estudado por suas propriedades sobre a pele (NOSARI *et al.*, 2015; PEREDA *et al.*, 2009; SAVIAN *et al.*, 2011; WAGEMAKER *et al.*, 2013; WAGEMAKER *et al.*, 2015). Este óleo pode ser extraído por processos mecânicos, como a prensagem a frio, sem nenhum tipo de solvente orgânico. Dessa forma, a obtenção do OCV por prensagem a frio dos grãos é

considerada uma técnica ambientalmente amigável (PEREDA *et al.*, 2009; LAGO; FREITAS, 2006).

Este óleo é rico em fitoesteróis que promovem excelente hidratação, rápida penetração e boa aderência, além de ser rico em ácidos graxos essenciais (SILVA, VIEIRA, HUBINGER, 2014; PEREDA *et al.*, 2009; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006). O OCV apresenta efeito regenerativo e hidratante da pele e por ter efeito estimulante pode ser usado também em formulações para redução de celulite, além de proteger a pele contra os danos causados pelas radiações solares, através da sua ação antioxidante, podendo aumentar o fator de proteção dos filtros solares (PEREDA *et al.*, 2009).

O OCV é rico em ácidos graxos insaturados com propriedades hidratantes, o que provavelmente confere sua propriedade de proteção da pele contra as radiações solares e ressecamento. O OCV é extraído do grão que por sua vez é constituído de proteínas, açúcares e uma fração lipídica. Segundo Poisson (1979), esta fração lipídica pode ser dividida em três categorias: ácidos graxos (AG) derivados de glicerídeos e fosfolipídios; constituintes da matéria insaponificável, esteróis, di e triterpenos e tocoferóis e constituintes da cera que recobre o grão.

De acordo com Maier, Mätzel (1982) e Folstar (1985), a fração lipídica do café tem como principais componentes os triglicerídeos (75,2%), ésteres de álcoois diterpênicos e ácidos graxos (18,5%), álcoois diterpênicos (0,4%), ésteres de esteróis (3,2%), esteróis (2,2%), tocoferóis (0,04 a 0,06%), fosfatídeos (0,1 a 0,5%) e derivados de triptamina (0,6 a 1,0%). Segundo Folstar (1985) no óleo de *C. arabica* são encontrados os seguintes AG: ácido mirístico (0,2%), ácido palmítico (35,2 a 36,7%), ácido esteárico (7,2 a 9,7%), ácido oleico (9,5 a 11,9%), ácido linoleico (41,2 a 42,6%), ácido linolênico (1,3 a 2,7%) e ácido araquídico (0,3 a 1,5%).

Recentemente, WAGEMAKER (2011) caracterizou a fração lipídica de diversas variedades de café, considerando a *C. arábica* a espécie mais importante, apresentando alto conteúdo de óleos e ceras, rica composição em ácidos graxos insaturados e matéria insaponificável. Os valores obtidos para a composição de AGs presentes na referida espécie estão próximos aos encontrados em estudos anteriores, sendo: ácido palmítico 30,2%, esteárico 8%, oleico 10,6%, linoleico 46,3%, linolênico 1,6% e araquídico 2,3%.

Outro estudo da composição do OCV foi feito por D'Amélio *et al.* (2013), onde fizeram uma comparação entre os resultados obtidos utilizando cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMN-AR). Segundo os autores, a utilização de RMN-AR dispensa as reações de hidrólise e esterificação que são necessárias para a análise em CG, porém segundo os valores obtidos a RMN-AR foram detectados apenas três ácidos graxos (oleico 9,3%; linoleico 49,5% e linolênico 1,7%). Já a caracterização por CG detectou os seguintes AGs: ácido mirístico 0,05%; palmítico 27,6%; esteárico 9,01%; araquídico 4,05%; behênico 1,12%; oleico 9,21%; linoleico 47,47% e linolênico 1,48%.

Vale ressaltar que por se tratar de um composto natural, pequenas alterações nas porcentagens de AGs são totalmente aceitáveis, uma vez que o conteúdo graxo pode variar dependendo de fatores tais como solo, colheita e clima (WAGEMAKER, *et al.*, 2011; D'AMELIO, *et al.*, 2013)

Muitos destes compostos apresentam efeito protetor contra danos causados à pele, tais como queimaduras solares e fotoenvelhecimento, por isso têm sido sérios candidatos a ativos em composições dermocosméticas. (NAKAYAMA *et al.*, 2003 e BOELSMA, *et al.*, 2001).

2.2. Associação com α -tocoferol

Para melhorar o poder antioxidante do OCV, este pode ser associado ao α -tocoferol, que é um dos quatro isômeros do tocoferol. Esta substância é muito utilizada no mercado cosmético com a finalidade de auxiliar a ação dos filtros solares, sendo descrita como um dos mais importantes antioxidantes lipossolúveis ligados à membrana celular. Sua associação em filtros solares é devido à potencialização do efeito atenuador da radiação UV (HANSON; CLEGG, 2003; IDSON, 1993).

2.3. Técnicas de Produção de Micro e Nanoestruturas Contendo Lipídios

Existem inúmeras técnicas para o preparo de micro e nanopartículas. Em sistemas microparticulados o ativo é distribuído dentro de pequenas partículas que podem ser denominadas microcápsulas ou microesferas. Nas

microcápsulas, o sistema forma um reservatório contendo a substância ativa que é revestida por uma membrana de espessura variada. Essas estruturas também podem ser classificadas como mononuclear (um único núcleo) ou polinuclear (vários núcleos). Outra forma das micropartículas são as microesferas, onde o ativo encontra-se disperso e/ou dissolvido na matriz, podendo ser classificada como heterogênea ou homogênea (Figura 2).

Figura 2. Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva *et al.*, 2003)

Dessa forma, as microcápsulas são consideradas sistemas reservatório, já nas microesferas o ativo encontra-se disperso e/ou dissolvido na matriz, sendo chamada de homogênea quando a substância ativa encontra-se dissolvida na matriz ou heterogênea quando esta se encontra em suspensão (SILVA, *et al.*, 2003).

Os componentes lipofílicos representam um verdadeiro desafio para pesquisadores, uma vez que apresentam baixa solubilidade em água e certa dificuldade em ser incluídos em matrizes (DIMAS, *et al.* 2015).

A microencapsulação é definida como um processo onde minúsculas partículas ou gotas são cercadas ou incorporadas por um revestimento. Este processo pode fornecer uma barreira física para seus componentes (SILVA, *et al.* 2014). As micropartículas lipídicas sólidas (MLSs) apresentam um tamanho que varia entre 1 a 1000µm, podendo evitar a penetração dos ativos através do estrato córneo.

Existem muitos trabalhos utilizando matrizes poliméricas para encapsulação de óleos vegetais por *spray dryer*, incluindo a microencapsulação do OCV (SILVA, *et al.* 2014). Porém, estudos utilizando a técnica de *spray congealing* ainda são escassos. A ação potencial do OCV e a escassez de dados sobre microencapsulação por *spray congealing* fazem deste trabalho uma ferramenta singular para a utilização deste óleo em ativos cosméticos. Segundo Silva, *et al.* (2014), a microencapsulação do OCV melhora sua aplicação em pós cosméticos, como as maquiagens, além de diminuir possíveis reações alérgicas.

As micropartículas lipídicas sólidas (MLSs) são partículas formadas a partir de matrizes lipídicas, sendo considerada uma boa alternativa para a encapsulação de ativos lipofílicos. Dessa forma podem ser utilizadas como alternativa ao uso de polímeros, pois apresentam biocompatibilidade favorável e menor toxicidade quando comparadas a muitos polímeros (PASSERINI *et al.*, 2010; PERGE *et al.*, 2012; NANJWADE *et al.*, 2011).

As MLSs são capazes de incorporar grande quantidade de ativos lipofílicos além de permitir uma produção em larga escala a um custo relativamente menor que os lipossomas (NANJWADE *et al.*, 2011).

A produção de micro e nanopartículas pode ser uma alternativa para transformar óleos vegetais em pós, mantendo seus compostos ativos e facilitando a manipulação, armazenamento e aplicação em produtos (CARVALHO, *et al.* 2014).

Existem diversas técnicas para produção de micro e nanoestruturas tais como o leito fluidizado, a coacervação, o *spray drying*, o *spray congealing*, método de microemulsão à quente, emulsificação e evaporação do solvente, difusão de solvente, homogeneização à alta pressão, entre outras. Dentre estes métodos destaca-se o *spray congealing* para a produção de MLSs, pois se trata de uma técnica que garante inúmeras vantagens quando comparada às tradicionais, uma vez que é segura, rápida, econômica e ecologicamente correta, pois dispensa o uso de qualquer tipo de solvente, sejam eles aquosos ou orgânicos. Para a obtenção de NLSs destaca-se a microemulsão a quente, que é uma técnica interessante, pois também pode dispensar a utilização solventes orgânicos. Além disto, microemulsões são sistemas heterogêneos termodinamicamente estáveis podendo ser formados espontaneamente devido

à tensão interfacial reduzida entre uma fase interna e uma fase externa. (ALBERTINI *et al.*, 2008; PASSERINI *et al.*, 2006; SOUTO *et al.*, 2011).

A técnica de *spray congealing* é semelhante à de *spray drying*, sendo os princípios básicos similares. Dessa forma, o mesmo equipamento pode ser utilizado desde que sejam feitas algumas adaptações (Figura 3), uma vez que o fluxo de energia é diferente. No *spray drying* o calor aplicado provoca a evaporação do solvente presente nas gotículas, ou seja, o calor é transportado do ar quente para as gotas atomizadas. Já no *spray congealing*, o ar resfriado remove calor das gotículas quentes, levando a solidificação do veículo fundido (ILIC *et al.*, 2009; KILLEN, 1993).

Figura 3. Esquema das adaptações feitas no *spray dryer* para o uso da técnica de *spray congealing*.

As modificações necessárias no equipamento de *spray dryer* para a técnica de *spray congealing*, são: (1) Para o transporte da mistura fundida até o bico atomizador é necessário que haja o aquecimento desta mangueira, que é feito através do recobrimento da mesma por uma fita aquecedora. Dessa

forma, a temperatura se manterá constante por todo o percurso, evitando a solidificação da mistura e consequentemente o entupimento da mangueira. (2) Para manter o bico nebulizador aquecido, outra bomba peristáltica é responsável pela circulação de um óleo aquecido em alta temperatura (acima do ponto de fusão do veículo), o que permitirá uma temperatura constante no bico evitando a solidificação da mistura e consequentemente o entupimento do bico.

Na técnica de *spray congealing* as micropartículas são formadas a partir da pulverização do ativo dissolvido ou disperso num carreador fundido (geralmente 10°C acima do ponto de fusão do carreador) em uma câmara de resfriamento onde as gotículas pulverizadas entram em contato com o ar frio, causando a solidificação do material e a formação das micropartículas (MCCARRON, DONNELLY, AL-KASSAS, 2008). Esta técnica transforma matérias-primas fundidas em partículas de tamanho controlado e de fluxo livre, sendo considerada rápida e onde a produção das micropartículas é feita em uma única etapa (PASSERINI *et al.*, 2006). O *spray congealing* apresenta inúmeras vantagens, sendo importante seu estudo no país, uma vez que encontra aplicação na indústria química, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (MACHADO, 2011; MARTINS, 2010; NOSARI, 2012; PEREIRA, 2012).

A nanotecnologia é a ciência que estuda matérias em escalas extremamente pequenas. Uma nova geração de ativos com propriedades de liberação modificada foi desenvolvida utilizando essa tecnologia, criando assim o conceito nanoterapia. A produção de sistemas nanoparticulados pode oferecer uma liberação diferenciada de compostos já comercializados em outra escala (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; DIMA, *et al.*, 2015).

O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, sendo diferenciadas pela composição e organização estrutural. As nanocápsulas apresentam um núcleo oleoso, onde o ativo pode ou não estar dissolvido. Já as nanoesferas são formadas pela matriz polimérica onde o fármaco encontra-se retido ou adsorvido, conforme Figura 4 (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003).

Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas, sendo: a. nanocápsulas com o fármaco dissolvido no núcleo; b. fármaco adsorvido na parede da matriz; c. fármaco retido na matriz; d. fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) podem ser aplicadas em qualquer via, inclusive em via tópica. Esses carreadores são alternativas ao uso de lipossomas e nanopartículas poliméricas, apresentando especial uso para a aplicação cutânea devido suas propriedades oclusivas, formação de filme sobre a pele, liberação controlada e estabilização de substâncias encapsuladas (PASSERINI *et al.*, 2009; SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; DIMA, *et al.*, 2015).

As NLSs apresentam uma faixa de tamanho que varia entre 50 e 1000nm e são compostas por lipídios fisiologicamente biocompatíveis.

Essas nanoestruturas podem aumentar a absorção percutânea de fármacos além de permitir uma ação direcionada em locais específicos da pele. A formação de um filme e um efeito oclusivo formado pela aderência das NLSs sobre a pele pode levar a uma maior penetração destas partículas em camadas mais profundas da pele (PASSERINI *et al.*, 2009).

A composição lipídica das NLSs e NLSs tornam essas estruturas biodegradáveis e biocompatíveis com a pele. O uso de técnicas para obtenção de micro e nanoestruturas pode levar a um melhor direcionamento e aproveitamento dos ativos aplicados sobre a pele, uma vez que o mesmo produto pode ter efeitos diferentes apenas alterando o tamanho das partículas aplicadas (PASSERINI *et al.*, 2009, DIMA, *et al.*, 2015).

Sendo os sistemas micro e nanoestruturados alternativas para a proteção de ativos oleosos e uma possibilidade para o desenvolvimento de um

novo sistema de liberação se faz necessário estudos nesta área uma vez que o uso de óleos vegetais é muito comum na indústria cosmética (KAUR; SARAF, 2010; SAVIAN *et al.*, 2011; PARDAUIL *et al.*, 2011). Porém estudos utilizando sistemas micro e nano estruturados contendo esses óleos naturais ainda são pouco encontrados na literatura científica. Sendo assim pesquisas como esta podem trazer inúmeros benefícios, incluindo o desenvolvimento de novos produtos e/ou novos processos e avanços tecnológicos permitindo o crescimento e a competitividade deste setor tão importante para a economia deste país.

2.4. Tamanho de partículas e a pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, cobrindo quase toda sua extensão. Além de proteger o corpo contra agressões do meio ambiente, a pele também exerce funções termorreguladoras, táteis, metabólicas e imunológicas. É composta por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica e apresenta 3 camadas: epiderme, derme e hipoderme (BOUWSTRA *et al.*, 2003; KANITAKIS, 2002; WYSOCKI, 1999). A Figura 5 representa as camadas e as estruturas presentes na pele.

Figura 5. Imagem representativa das camadas e estruturas da pele (<http://www.vidacentro.com.br/conheca-sua-pele> - 20/08/2015)

O estrato córneo é a primeira barreira de proteção da pele, é a camada superficial da epiderme, sua espessura é de apenas cerca de 10 a 15µm. Sua matriz lipídica composta por ceramidas, ácidos graxos livres, esteróis e triacilglicerídeos, é responsável por evitar a perda de água transcutânea.

Abaixo se encontra a epiderme viável, composto principalmente pelas camadas basal, espinhosa e granular (HOATH; LEAHY, 2003; PROST-SQUARCIONI, 2006).

A derme apresenta cerca de 1 a 2mm de espessura e está localizada logo abaixo à epiderme. Composta basicamente por fibras colágenas e elásticas, conferindo suporte mecânico e elasticidade à pele. É a partir da derme que emergem os apêndices cutâneos (folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas) (BOUWSTRA *et al.*, 2003; CHIEN, 1992; PROST-SQUARCIONI, 2006).

A permeação cutânea, de forma geral, é feita pela difusão do ativo através da epiderme, sendo limitada pelo estrato córneo. A permeação através do estrato córneo intacto pode ser feita por duas vias, sendo a via intercelular, onde o ativo se difunde ao redor das células e a via transcelular onde o ativo passa através das células (AULTON, 2005). Outra rota alternativa para a permeação cutânea acontece via apêndices da pele, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Vias da permeação cutânea de ativos

(<http://revitaderme.blogspot.com.br/2014/05 - 20/08/2015>)

O tamanho da partícula é um importante parâmetro a ser estudado, pois influencia diretamente na permeação cutânea. Ainda é bastante controverso o tamanho ideal para uma partícula penetrar, porém estudos sugerem que partículas menores que 1µm podem ser capazes de atravessar o estrato córneo via transepidérmica e partículas entre 3 e 10µm parecem conseguir

penetrar via transfolicular. Os tamanhos de partículas superiores a 10µm parecem conseguir liberar o ativo apenas na superfície da pele (PITAKSUTEEPONG *et al.*, 2007; SHIM *et al.*, 2004).

2.5. Planejamento Experimental

Trata-se de uma importante ferramenta para o estudo de um processo com muitas variáveis, possibilitando um maior número de informações com um número reduzido de experimentos (FERREIRA *et al.*, 2007). As variáveis de um processo são alteradas e as respostas obtidas são analisadas, com o objetivo de determinar as condições que mais influenciam neste processo (SEOLATO *et al.*, 2009).

Estes planejamentos são representados por uma notação exponencial (X^n), onde a base indica o número de níveis e o expoente o número de fatores. Para cada fator são estipulados níveis, sendo considerados como níveis baixo, intermediário e alto, representados por -1, 0 e 1 (níveis codificados). Nestes estudos são consideradas dois tipos de variáveis: as respostas e os fatores. Cada nível irá fornecer uma resposta (variável dependente), dessa forma, os valores ótimos destes fatores podem ser determinados através do conhecimento das relações entre as respostas e os fatores estudados (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2003; MACHADO, 2011; FERREIRA *et al.*, 2007).

Para um melhor esclarecimento, seguem as definições de alguns termos utilizados no planejamento estatístico de experimentos:

- Resposta: Variável dependente observada pelo resultado obtido nos testes realizados em um conjunto específico de níveis dos fatores.
- Fatores: Conjunto de variáveis independentes que possivelmente irá interferir na resposta de um processo ou sistema.
- Níveis: Conjunto de valores definidos para cada fator.

Existem planejamentos experimentais completos e os fracionados. Nos planejamentos completos, todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores são estudadas, apresentando algumas desvantagens tais como demora e alto custo. Dessa forma são apropriados para experimentos menores. O planejamento fatorial fracionado reduz o número de ensaios, sendo utilizado

quando existe um grande número de fatores a ser estudado. Este otimiza o número de experimentos sem perder informações importantes, apresentando vantagens tais como rapidez e economia (RODRIGUES; IEMMA, 2009; MARTINS, 2010; MACHADO, 2011).

Segundo Galdámez (2002) e Montgomery (2004), para tornar os resultados dos processos mais confiáveis e tornar o planejamento experimental uma ferramenta mais eficiente é preciso seguir um tipo de protocolo. Este procedimento inclui: definir os objetivos, fazer um levantamento dos parâmetros do processo, selecionar os fatores e os níveis, realizar o experimento e então analisar os dados e interpretar os resultados.

2.5.1. Planejamento com misturas

Entende-se por mistura uma formulação ou uma composição de determinadas substâncias. O planejamento com misturas é um tipo de planejamento experimental onde todos os componentes de uma mistura são combinados formando 100% da composição da mesma. As respostas encontradas são em função da proporção entre os componentes desta mistura (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2003; REIS, ANDRADE, 1996).

Essa ferramenta tem como propósito tornar possível a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente através de uma superfície de resposta, com um número limitado de observações que são obtidas de combinações pré-selecionadas (REIS, ANDRADE, 1996).

Essas proporções podem ser representadas por um triângulo, onde cada componente puro da mistura é representado por um vértice, conforme Figura 7.

Figura 7. Gráfico de um planejamento com misturas

O espaço experimental em um planejamento com misturas é denominado *simplex*. Em misturas com três componentes, o *simplex* é um triângulo equilátero onde a soma das proporções é igual a um. Os vértices do triângulo representam os componentes puros, sobre os lados estão as misturas binárias e no interior as possíveis misturas ternárias. Alguns pontos pré-selecionados são escolhidos para ajustar em modelos matemáticos. Denomina-se planejamento experimental esse conjunto de combinações entre as proporções dos componentes. Nesse contexto, o planejamento deve cobrir toda a área de interesse, permitindo estimar o erro experimental. É conhecido como *simplex lattice* o delineamento cujos pontos estão uniformemente posicionados sobre o *simplex* (REIS, ANDRADE, 1996).

O delineamento de misturas permite uma análise de como as propriedades de interesse são afetadas pela variação de proporção dos componentes. Trata-se de um caso especial da metodologia do cálculo de superfície de resposta, que otimiza uma determinada propriedade de uma mistura em função de seus componentes, obtendo uma maior confiança nos resultados e eficiência em diminuir custos (CAMPOS *et al.*, 2007).

O planejamento com misturas difere dos planejamentos fatoriais, pois suas propriedades são determinadas pela proporção entre os seus componentes devendo totalizar 100%, ou seja, as proporções dos componentes não são independentes (CAMPOS *et al.*, 2007).

Muitos autores utilizaram este tipo de planejamento para otimizar ou verificar um possível sinergismos entre os componentes de uma mistura. Como Martinello *et al.* (2006) que utilizaram o planejamento com misturas para desenvolver e otimizar formulações contendo paracetamol, e também Castro *et al.* (2005) que usaram este modelo para avaliar a interação entre os componentes de uma mistura contendo licopeno, α -tocoferol e β -caroteno.

2.6. Análises Calorimétricas

Óleos insaturados e gorduras são extremamente susceptíveis à processos de auto-oxidação. Desta forma, a estabilidade oxidativa é um importante parâmetro para se avaliar a qualidade de óleos e gorduras. Muitas

técnicas têm sido desenvolvidas para a avaliação da estabilidade de substâncias oleosas (HASSEL *et al.*, 1976; RUDNIK *et al.*, 2000).

Análises calorimétricas, portanto, é um termo genérico utilizado para uma série técnicas que monitoram algumas alterações físicas ou químicas dos materiais em função da temperatura. Essas técnicas foram originadas primeiramente como ferramenta para a pesquisa de polímeros. Entretanto, com o tempo, as análises térmicas foram expandindo o seu âmbito de ação, tornando-se uma importante ferramenta de pesquisa e controle de qualidade (HASSEL *et al.*, 1976).

Recentemente técnicas termo analíticas estão sendo comumente utilizados para a investigação dos processos de auto-oxidação térmica de óleos e gorduras (RUDNIK, *et al.*, 2000). Dentre eles se destacam a calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e o teste RANCIMAT.

A calorimetria exploratória diferencial pode ser usada para avaliar o período de indução, baseando na formação de hidroperóxidos sob fluxo de oxigênio. (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999)

A análise termogravimétrica (TGA) baseia-se no estudo da medida de massa em função da temperatura, onde a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. (DANTAS *et al.*, 2007)

O aparelho RANCIMAT permite avaliar o teor de ácidos voláteis por condutimetria, onde a análise é baseada no registro das variações desta condutividade em água destilada. A oxidação desses compostos é feita em temperaturas entre 110-130°C sob corrente de oxigênio (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Segundo Carvalho (2011) as técnicas termo analíticas são mais vantajosos pois apresentam maior sensibilidade e precisão, além de utilizar uma pequena quantidade de amostra.

Rudnik *et al.* (2000) utilizaram técnicas termo analíticas em um estudo comparativo da estabilidade oxidativa do óleo de linhaça. Lima *et al.* (2007) utilizaram a técnica de TGA para a caracterização do biodiesel de babaçu obtido por via etanólica. Cordeiro *et al.* (2013) utilizaram o teste RANCIMAT como técnica acelerada para o estudo da estabilidade oxidativa do óleo de soja.

2.7. Estudos de estabilidade físico-química

Os estudos de estabilidade são utilizados para garantir as características iniciais de um produto. Parâmetros como aparência, viscosidade e teor de ativo devem ser mantidos por todo o prazo de validade determinado para o produto. Para garantir suas características iniciais durante todo o prazo de validade, os produtos cosméticos devem apresentar tais estudos.

Desta maneira, a avaliação do comportamento reológico vem sendo realizada uma vez que nem sempre a instabilidade pode ser detectada visualmente. Esse estudo visa obter informações sobre o escoamento e deformação de materiais sob influências de forças externas. Características reológicas podem fornecer dados importantes que podem ser utilizados desde a determinação do prazo de validade como para o processo de fabricação, e na aceitação da formulação pelo consumidor (CALLEGOS, FRANCO, 1999; GASPAR, MAIA-CAMPOS, 2003; LEONARDI, 2002; MARTIN *et al.* 1993).

Além da estabilidade física, a comprovação da estabilidade química é imprescindível para a manutenção da segurança e eficácia de um produto. Fatores como a oxidação de ativos devem ser monitorados para traçar um perfil de degradação e assim determinar um prazo de validade, assegurando que o teor seja mantido durante todo o prazo (BAHIA, 2003; GASPAR, MAIA-CAMPOS, 2003). A avaliação da estabilidade química pode ser feita através do estudo da degradação de seus componentes, sendo os métodos cromatográficos de grande valia para a separação, identificação e quantificação de substâncias.

Os testes de estabilidade podem ser classificados como estudos de curto ou de longo prazo, dependendo de sua duração. O prazo de validade real é determinado por estudos de longo prazo e realizado à temperatura ambiente. Já os estudos acelerados, são feitos em curto prazo e predizem um valor para o período de vida útil, onde este será confirmado posteriormente com um estudo realizado em longo prazo. Nos testes acelerados, o produto é armazenado em condições de estresse (luz, calor ou mecânico) com o intuito de acelerar as reações que poderiam acontecer ao longo do tempo (SARKA *et al.*, 2006)

O estudo da estabilidade das formulações contendo OCV se faz importante tendo em vista sua rica composição e efeitos benéficos de cuidados com a pele. Dessa forma, para obter uma formulação estável e efetiva é necessário conhecer suas características físico-químicas, avaliando parâmetros importantes tais como, comportamento reológico e degradação.

2.8. Ensaios de toxicidade e citotoxicidade

Apesar da crença na inofensibilidade dos produtos naturais, existem diversos relatos de reações adversas causados por extratos de plantas, tais como dermatites e urticárias (WAGEMAKER, *et al.* 2015). Dessa forma, uma análise da toxicidade e citotoxicidade do OCV se fazem importantes, tendo em vista que recentemente esses estudos para avaliar a segurança de cosméticos têm sido amplamente realizados em testes *in vitro*, reduzindo, portanto o uso de animais.

Até pouco tempo atrás, a avaliação da segurança de produtos cosméticos baseava-se em testes *in vivo*, o que levava a uma grande utilização de animais. Nos últimos anos, muitos testes de segurança cosmética *in vitro* têm sido desenvolvidos, pois em 2013 o Parlamento Europeu aprovou a lei que proíbe a utilização de dados para testes de segurança que tenham sido obtidos por meio de experiências em animais em toda a cadeia cosmética. Com este banimento, diferentes estratégias têm sido avaliadas e desenvolvidas baseando-se em toxicologia computacional, otimização de testes existentes ou desenvolvendo novas abordagens *in vitro* (WAGEMAKER, *et al.* 2015). Muitos estudos de segurança têm sido feitos em cultura de células, sendo assim o método XTT foi selecionado por ser um estudo simples e muito utilizado na pesquisa para avaliar a citotoxicidade.

Os estudos de citotoxicidade realizados para avaliar a letalidade em *Artemia salina* são considerados preliminares, utilizados comumente como triagem para estudos de toxicidade de substâncias bioativas. Os ensaios em *Artemia salina* apresentam as vantagens de serem rápidos, fácil execução, simples e requerem pequenas quantidades de amostra. É uma ferramenta útil para avaliação preliminar da toxicidade, que embora seja um teste preliminar é

amplamente utilizado para investigar a segurança de muitos ativos (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008).

A *Artemia salina* é um invertebrado de ecossistemas marinhos, considerado um organismo simples, de fácil cultivo além de ser resistente à manipulação. A letalidade nesses organismos tem sido estudada através de um simples monitoramento da resposta biológica, onde envolve os parâmetros: morte ou vida e os resultados são facilmente tratados estatisticamente. Considera-se que estas larvas apresentam sensibilidade à substâncias tóxicas. (KANWAR, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2000; CARBALLO *et al.*, 2002; SANTOS PIMENTA *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2006).

Meyer *et al.* (1982) propôs uma metodologia com estes ensaios para investigar constituintes bioativos de plantas. E a partir de então, devido a sua simplicidade e conveniência tem sido amplamente utilizado.

Outra forma de se avaliar a citotoxicidade *in vitro* é por meio de ensaios colorimétricos. Dentre eles destaca-se o ensaio XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio), onde a viabilidade celular é determinada baseando-se na conversão do XTT em derivados coloridos de formazan, pelas enzimas das células metabolicamente ativas.

2.9. Avaliação do potencial fotoprotetor

A luz solar que incide sobre a terra é composta por radiação eletromagnética que é dividida de acordo com o seu comprimento de onda: ultravioleta (UV) que compreende os comprimentos de onda entre 100 e 400nm, visível (Vis) entre 400 e 800nm e finalmente o infravermelho (IV) acima de 800nm (NISHIKAWA, *et al.* 2013)

Os filtros solares e agentes antioxidantes podem ser destacados dentre os produtos para proteção da pele por serem capazes de prevenir danos causados à pele pela radiação UV, como câncer e envelhecimento precoce. (CHIARI, *et al.* 2014).

A exposição crônica da pele à radiação UV é o fator mais importante causador de distúrbios tais como envelhecimento, ressecamento e manchas. Esta radiação causa um desequilíbrio intracelular proveniente da formação dos

radicais livres (CHIARI, *et al.* 2014). Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam elétrons não pareados, essa falta em sua estrutura química faz com que esses radicais “roubem” elétrons de outras moléculas para assim se tornarem estáveis, estabelecendo então uma reação em cadeia, uma vez que as moléculas atacadas tornam-se novos radicais livres, causando vários danos ao organismo. Essa presença de elétrons desemparelhados fazem dos radicais livres moléculas altamente reativas, que podem participar de reações indesejáveis, resultando em danos celulares. Reações entre radicais livres e DNA, por exemplo, podem resultar em mutações e afetar negativamente o ciclo celular, podendo casar câncer.

Dessa forma, um papel importante dos antioxidantes é bloquear as reações de oxidação, retardando ou impedindo o dano oxidativo causado pelos radicais livres.

Muitos protetores solares são baseados em compostos químicos sintéticos com alta capacidade de absorção de luz na região UVB e UVA. Porém, protetores sintéticos podem resultar em subprodutos provenientes de sua fotodegradação e atualmente tem sido relatados históricos de reações adversas ocasionadas pelo uso tópico de grandes concentrações de filtros sintéticos. Sendo assim, existe uma tendência de mercado focada no desenvolvimento e produção de fotoprotetores contendo concentrações reduzidas de filtros químicos. A associação de produtos naturais com ação antioxidante nesse tipo de formulação pode ajudar a reduzir o uso de compostos sintéticos e também aumentar a sua atividade fotoprotetora. (CHIARI, *et al.* 2014; NISHIKAWA, *et al.* 2013)

De uma maneira geral, os produtos naturais são menos prejudiciais ao organismo, pode ser utilizado em uma grande variedade de produtos, além de serem obtidos de fontes renováveis. Nesse contexto, o OCV tem sido estudado como um potencial composto natural para ser utilizado em formulações fotoprotetoras, por apresentar uma rica fonte de antioxidantes e polifenóis (CHIARI, *et al.* 2014).

A determinação do FPS avalia a eficácia dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Esta radiação é responsável por causar eritemas e compreende os comprimentos de onda entre 290 – 320nm.

Um filtro solar eficaz é capaz de proteger a pele contra a queimadura solar, o FPS indica em quantas vezes o tempo de exposição solar pode ser aumentado, sem causar riscos de eritema (DAMIANI *et al.*, 2005; MANSUR *et al.*, 1986).

A avaliação do FPS *in vitro* por técnica espectrofotométrica destaca-se por ser considerado rápido, fácil, custo acessível, além de não necessitar a exposição de voluntários ou animais à radiação (VELASCO *et al.*, 2008).

Vários autores utilizaram o método espectrofotométrico para avaliar o FPS *in vitro* de várias substâncias, como por exemplo, óleo de andiroba (FERRARI *et al.*, 2007), vários extratos vegetais (RAMOS *et al.*, 1996), óleo de café (WAGEMAKER *et al.*, 2011).

Mansur *et al.* (1986) desenvolveram um método para determinar o FPS *in vitro*, onde é feita uma varredura da absorbância em comprimentos de onda entre 290 e 320nm, em intervalos de 5nm. São feitos cálculos através de fórmula específica para a obtenção do valor de FPS *in vitro*.

A avaliação espectrofotométrica do FPS é feita para a triagem de substâncias consideradas promissoras para absorver a radiação UVB.

Outra técnica utilizada para determinar a eficácia *in vitro* de fotoprotetores é feito em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000-S). Neste método, um feixe de luz de xenônio atravessa uma superfície recoberta por um substrato (placas de polimetilmetacrilato) onde as amostras são aplicadas uniformemente. Este substrato sintético é utilizado para mimetizar a rugosidade da pele (NISHIKAWA *et al.*, 2013). A transmitância hemisférica total é medida por uma esfera de integração que coleta a luz dispersada em todos os ângulos, sendo considerado um método rápido e fácil de ser executado (VELASCO *et al.* 2008).

2.10. Permeação Cutânea

A permeação cutânea é definida como a passagem de uma substância através da pele. Quando um fármaco é administrado por via tópica, basicamente ocorre a difusão deste através das camadas da pele, podendo atravessar o estrato córneo pelas vias intercelular e anexial (apêndices da

pele). A passagem da substância ao redor dos corneócitos caracteriza a via intercelular, porém um fármaco pode atingir camadas mais profundas através da absorção pelas glândulas sebáceas, sudoríparas ou pelos folículos pilosos (CARNEIRO, 2007; GRATIER *et al.*, 2008)

Ensaio de permeação cutânea são importantes para verificar a absorção de substâncias, bem como permite compreender e avaliar o desempenho de uma formulação (NEMEM, 2010).

Uma vez que a alteração do tamanho das partículas pode fornecer ações diferenciadas para um mesmo produto, os estudos de permeação e retenção cutânea são de extrema importância para verificar o local de ação das mesmas (SILVA, *et al.*, 2014).

As células de difusão de Franz (Figura 8) são frequentemente utilizadas para a realização de testes de permeação e retenção cutânea de fármacos. Estas são constituídas por um compartimento superior doador e um compartimento inferior receptor, separados por uma membrana sintética ou pele (FRANZ, 1975).

Fonte: Silva, 2010

Figura 8. Célula de difusão de Franz.

Os estudos feitos empregando fragmentos de pele se encontram mais próximos de reproduzir as condições *in vivo* quando comparados àqueles utilizando membranas sintéticas. A pele de orelha de porco tem sido

considerada mais relevante por suas propriedades serem semelhantes à pele humana (LIRA, 2003; REIFENRATH *et al.*, 1991; JACOB *et al.*, 2006).

A quantificação da substância pode ser feita através da verificação da quantidade permeada presente no meio receptor, no estrato córneo retirado pela técnica de *tape stripping* (Figura 9) e àquela presente na epiderme e derme (sem estrato córneo). Os valores podem ser expressos como porcentagem da quantidade de fármaco contida na dose aplicada ou como valor absoluto em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele (MACCARI, 2011).

Figura 9. Técnica de *tape stripping*. Figura adaptada de ANROOP *et al.*, 2013.

2.11. Ensaios clínicos

As propriedades físicas e a aparência da pele são determinadas pela hidratação do estrato córneo, podendo ser influenciada por fatores como umidade externa, composição lipoprotéica, função barreira e pela concentração de substâncias capazes de reter água na pele.

Segundo ABURJAI e NATSHEH (2003) uma formulação cosmética natural é caracterizada por uma composição lipídica semelhante ao manto lipídico cutâneo.

O OCV vem sendo utilizado na indústria de cosméticos por sua habilidade em ajudar manter a umidade natural da pele. O ácido linoleico, principal ácido graxo deste óleo, fornece alívio para eczemas além de apresentar propriedades terapêuticas para o tratamento de dermatites (WAGEMAKER, *et al.* 2011).

Por ser uma mistura complexa de triglicerídeos e rica em AGs, o OCV apresenta uma composição muito similar à pele, podendo ajudá-la a manter ou recuperar sua hidratação.

O OCV tem sido usado em produtos cosméticos devido às suas propriedades emoliente e hidratante, além de proteger a pele contra o envelhecimento e absorver a radiação UVB. Estudos mostram um aumento significativo no colágeno e elastina em culturas de células de queratinócitos tratados com OCV (AZEVEDO, *et al.* 2008; VELAZQUEZ-PEREDA, *et al.* 2009). Uma diminuição na perda de água transepidérmica foi observada por Wagemaker (2013) em um estudo realizado em voluntárias após 24 e 48 horas, com formulações contendo 15% de OCV.

Para o desenvolvimento de novos produtos é fundamental a comprovação de sua eficácia. Diversos equipamentos são utilizados para avaliar diferentes parâmetros da pele, tais como conteúdo aquoso do estrato córneo e perda transepidérmica de água (MAIA CAMPOS *et al.*, 2008).

Novos equipamentos para avaliar diferentes efeitos das formulações cosméticas sobre a pele vêm sendo desenvolvidos como alternativa de uma técnica não invasiva. Dentre os parâmetros avaliados pode-se destacar o conteúdo aquoso do estrato córneo e a perda transepidérmica de água (MERCURIO, 2012).

Um filme hidrolipídico presente no estrato córneo forma uma barreira protetora, evitando a penetração de substâncias e protegendo a pele do ressecamento, mantendo sua flexibilidade (MAIA CAMPOS *et al.*, 2008). Para a avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo destaca-se o Corneometer[®], que utiliza corrente de baixa frequência medindo a capacitância de acordo com a constante dielétrica da água. Este método é bastante utilizado pois apresenta pouca influência de fatores como temperatura e umidade relativas (DAL'BELO *et al.*, 2006).

Outro parâmetro utilizado é a perda transepidérmica de água, este pode ser avaliado utilizando o equipamento Tewameter[®], que avalia a integridade da barreira da pele para a perda de água insensível. Neste caso, valores menores significam menores perdas de água e maior integridade da barreira (LEONARDI *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que um produto cosmético para ter boa aceitação precisa apresentar propriedades sensoriais adequadas tais como, suavidade, rápida absorção e espalhabilidade (WAGEMAKER, *et al.* 2013). Dessa forma, o uso de óleos vegetais em produtos cosméticos torna-se um desafio, pois sua composição lipídica pode acarretar em propriedades indesejáveis como oleosidade e pegajosidade. Segundo um estudo sensorial feito por Wagemaker *et al.* (2013), altas concentrações do OCV em formulações cosméticas resultaram em percepções desagradáveis em algumas voluntárias. Nesse contexto, a produção de micro e nanopartículas pode favorecer o desenvolvimento de formulações contendo menores quantidades de óleo, mantendo a mesma ação protetora e hidratante das formulações que contém altos índices dessas substâncias.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver micro e nanopartículas à base de cera de abelhas purificada como carreador e contendo OCV aditivado com α -tocoferol para a incorporação em gel hidrofílico.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a composição química do OCV utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).
- Estudar a produção de micropartículas de cera de abelha contendo OCV pelo processo de *spray congealing*, avaliando os fatores de processo e as características das micropartículas produzidas.
- Estudar a produção de nanopartículas de cera de abelha contendo OCV pelo processo de microemulsão à quente, avaliando os fatores de processo e as características das nanopartículas produzidas.
- Avaliar a estabilidade oxidativa da mistura de OCV, alfa-tocoferol e cera de abelha pelos métodos de Rancimat[®] modificado e da análise termogravimétrica.
- Produzir três hidrogéis contendo, separadamente, micropartículas, nanopartículas e OCV) e avaliar a estabilidade destes.
- Avaliar as propriedades de fotoproteção dos três hidrogéis pela técnica de curvas de absorvência e pela espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.
- Avaliar a permeação e retenção do OCV, através do marcador químico (ácido palmítico), pelo método da célula de difusão vertical (célula de Franz).
- Avaliar os efeitos dos três hidrogéis sobre a biofísica da pele humana pelo conteúdo do estrato córneo e perda transepidérmica de água.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas e reagentes

- Acetato de α -tocoferol (Via Farma Ltda, São Paulo, Brasil)
- Cera de abelha (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo Brasil)
- D-MEM (Sigma-Aldrich Ltda, São Paulo, Brasil)
- Etanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona Neutralizado - Aristoflex AVC[®] (Clariant Ltd, São Paulo, Brasil)
- Polímero carboxivinílico - Carbopol[®] (Goodrich, Goodrich Company, Ohio, EUA)
- Carboximetilcelulose - CMC (Fagron do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- Hidroxietilcelulose - Natrosol[®] (Ashland Inc, São Paulo, SP)
- Linhagem celular L929 (gentilmente cedida pela Professora Dra. Maria José Vieira Fonseca, FCFRP-USP)
- Kit de ácidos graxos - (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- Kit de proliferação celular XTT (GNT LAB ME, Ribeirão Preto, SP)
- Metanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- N-Hexano (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- Óleo de café verde – Lote CN 102-0811, Laudo 24230 (Chemunion Química Ltda, Sorocaba, Brasil)
- Ovos de *Artemia salina* - Ovos de alta eclosão (Maramar, Arraial do Cabo, Brasil)
- Polissorbato 80 (Via Farma Ltda, São Paulo, Brasil)
- Poloxamer 400 (Via Farma Ltda, São Paulo, Brasil)
- Etanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- Metanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)
- N-Hexano (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)

4.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos vórtex - digital MS3 (IKA Works Inc, EUA)

- Agitador magnético com aquecimento – TE0851 (Tecnal, Brasil)
- Analisador de estabilidade oxidativa – Rancimat 873 (Metrohm, Suíça)
- Analisador de tamanho de partícula – LS 13320 (Beckman Coulter, EUA)
- Analisador de tamanho de partícula – Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK)
- Anemômetro – MDA 11 (Minipa, Joinville, Brasil)
- Balança analítica – OHAUS Explorer (OHAUS Corporation, EUA)
- Balança determinadora de umidade – MB45 (OHAUS Corporation, EUA)
- Balança eletrônica – O HAUS Explorer (OHAUS Corporation, EUA)
- Bomba peristáltica – Masterflex 7524-50 (Cole Parmer, EUA)
- Corneometer® CM825 (Courage-Khazaka, Alemanha)
- Cromatógrafo à gás – GC-MS 7890A (Agilent Technologies, EUA)
- Desruptor de células ultrassônico – DES500 (Unique Group, Brasil)
- Espectrofotometria - Espectrofotômetro UV/Vis M330 (Camspec Ltd, Reino Unido)
- Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração - Labsphere® UV2000-S (Labsphere, EUA)
- Incubadoras COM-19AICUV-PA (Panasonic Corporation, Japão)
- Reômetro – R/S-CPS (Brookfield, EUA)
- Spray dryer – MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Brasil)
- Termogravimetria – SDT2960 Simultaneous DTA-TGA (TA Instruments, EUA)
- Tewameter® TM 210 (Courage-Khazaka, Alemanha)
- Ultra-turrax – T25 Digital (IKA Works Inc, EUA)

4.3. Métodos

4.3.1. Caracterização do óleo de café verde

A caracterização do OCV foi feita por cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrômetro de massa (GC-MS, Agilent Technologies, EUA) utilizando detector D 5975C (single quadrupole) e coluna HP-05 MS (Agilent Technologies, EUA) de 30m de comprimento, 0,25mm de espessura e 0,25µm

de diâmetro interno. O volume de injeção foi de 1 μ L e foi usado Hélio como gás de arraste. A rampa de aquecimento teve início à 130°C, com aumentos de 10°C por minuto até atingir 230°C, mantendo esta temperatura por 5 minutos. Após esse tempo foram feitos aumentos de 20°C por minuto até atingir 280°C, onde se manteve por mais um minuto. Foram utilizados padrões dos ácidos palmítico e esteárico para fazer as curvas analíticas.

As amostras para as análises cromatográficas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), aplicada na preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 8 ou mais átomos de carbono.

Os ésteres metílicos foram preparados através de reações de hidrólise seguidas por reações de esterificação. Cada amostra, padrões ou OCV, foi pesada (100mg) e colocada em tubo falcon seguido pela adição de 3mL de n-hexano. Após solubilização, foram adicionados 4mL de uma solução 0,5M de hidróxido de sódio e aquecido em banho de água, utilizando agitador magnético com aquecimento (TE0851, Tecnal, Brasil) com temperatura controlada entre 65 e 70°C por 3 minutos. O tubo foi resfriado em água corrente e então adicionado 5mL da solução esterificante, contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico. O tubo foi fechado, agitado por 30 segundos em agitador tipo vortex (MS3, IKA Works, EUA) e aquecido novamente por 5 minutos. Em seguida, resfriou-se rapidamente o tubo em água corrente e adicionou-se 4mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos em agitador tipo vortex (MS3, IKA Works, EUA). Finalizando, foram adicionados 3mL de n-hexano e o tubo foi novamente agitado em vortex por mais 30 segundos. Os tubos foram deixados em suportes adequados para que ocorresse a separação das fases. A fase superior formada foi retirada com auxílio de uma micropipeta, transferido para um vial e então foi realizada a análise por cromatografia gasosa.

4.3.2. Estudo do processo para o preparo dos sistemas micro e nano particulados

4.3.2.1. Micropartículas

Os sistemas microparticulados contendo OCV associado com α -tocoferol (OCV- α) foram obtidos através da técnica de *spray congealing*. Primeiramente, para o estudo do processo, foi feito um planejamento fatorial completo (2^3), onde três variáveis foram estudadas em dois níveis: temperatura, vazão de dispersão e vazão do ar de resfriamento (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis reais e codificadas do planejamento experimental completo.

Ensaio	VC* T	T(°C)	VC* VD	VD (mL/min)	VC* VAR	VAR (m ³ /min)
1	-1	-4	-1	4,5	-1	1,0
2	+1	+4	-1	4,5	-1	1,0
3	-1	-4	+1	9	-1	1,0
4	+1	+4	+1	9	-1	1,0
5	-1	-4	-1	4,5	+1	1,5
6	+1	+4	-1	4,5	+1	1,5
7	-1	-4	+1	9	+1	1,5
8	+1	+4	+1	9	+1	1,5

*Variáveis Codificadas (T = temperatura; VD vazão de dispersão; VAR vazão do ar de resfriamento).

Neste primeiro momento não houve variação na formulação, pois o objetivo foi determinar a melhor condição do processo utilizando a técnica de *spray congealing*. Um aparelho de *spray dryer* (MSD 0,5, Labmaq do Brasil Ltda, Brasil) foi modificado para o uso a técnica de *spray congealing*.

Para o preparo das MLSs, a técnica foi operada em modo co-corrente, com bico nebulizador do tipo duplo fluido, onde o ar comprimido e a dispersão estão em entradas distintas. A amostra foi atomizada por um bico nebulizador com orifício de saída de 1,2mm, formando gotículas do material fundido que se solidificam ao entrarem em contato com o ar resfriado presente na câmara de resfriamento com um diâmetro interno de 13cm e 51cm de comprimento. A vazão do ar de resfriamento foi determinada na saída de ar frio localizada no ciclone separador por um anemômetro (MDA 11, Minipa, Joinville, Brasil). A mistura fundida foi mantida aquecida em agitador magnético com aquecimento

(TE0851, Tecnal, Brasil). Com o auxílio de uma bomba peristáltica com vazão ajustável a mistura foi levada até o bico nebulizador através de uma mangueira de silicone que foi mantida em aquecimento controlado (100°C) por uma fita aquecedora (Fisatom Ltda, São Paulo, Brasil) e sensor tipo PT 100 conectado a um controlador digital modelo HW 500 (Coel Ltda, São Paulo, Brasil). Esse aquecimento é necessário para evitar a solidificação da amostra dentro da mangueira de silicone.

Nesta fase, todas as amostras foram compostas por: 12g (40%) de OCV; 1,5g (5%) de α -tocoferol; 16,5g (55%) de cera de abelha, totalizando 30g de amostra. A cera de abelha foi pesada em balança eletrônica (OHAUS Corporation, EUA) e aquecida até sua fusão (65 ± 2 °C) em agitador magnético com aquecimento TE0851 (Tecnal, Brasil), mantendo aquecimento constante em 10°C acima do seu ponto de fusão. Separadamente foram pesados o OCV e o α -tocoferol e em seguida adicionados à matriz sob agitação constante em agitador magnético TE0851 (Tecnal, Brasil). Após total homogeneização, a mistura foi atomizada utilizando a técnica de *spray congealing* e as microestruturas foram coletadas em um frasco.

4.3.2.2. Nanopartículas

As nanopartículas contendo OCV- α foram obtidas através da técnica de microemulsão a quente. Neste caso, o estudo do processo foi feito por um planejamento experimental saturado do tipo Plackett-Burman, estudando cinco variáveis em dois níveis (2^{5-2}), totalizando oito ensaios. Nessa fase foram feitos dois planejamentos iguais alterando apenas a forma de agitação, um foi realizado utilizando agitação por alto cisalhamento, através de um ultra-turrax modelo T25 digital (IKA Works Inc, EUA) e o outro por ultrassom através de um disruptor de células ultrassônico modelo DES500 (Unique Goup, Brasil). As variáveis estudadas foram velocidade no caso do alto cisalhamento ou potência no caso do ultrassom; tempo; quantidade de tensoativo (twen 80 e poloxamer 407) e temperatura, conforme Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Variáveis codificadas e reais do planejamento experimental saturado, aplicando alto cisalhamento.

Ensaio	V		t		Twen 80		Poloxamer		T	
	(rpm)		(min)		(g)		407 (g)		(°C)	
T1	-1	8.000	-1	5	-1	2	-1	2	+1	80
T2	+1	16.000	-1	5	-1	2	+1	4	-1	70
T3	-1	8.000	+1	20	-1	2	+1	4	-1	70
T4	+1	16.000	+1	20	-1	2	-1	2	+1	80
T5	-1	8.000	-1	5	+1	4	+1	4	+1	80
T6	+1	16.000	-1	5	+1	4	-1	2	-1	70
T7	-1	8.000	+1	20	+1	4	-1	2	-1	70
T8	+1	16.000	+1	20	+1	4	+1	4	+1	80

Onde V= velocidade; t= tempo e T= temperatura

Tabela 3. Variáveis codificadas e reais do planejamento experimental saturado, aplicando o ultrassom.

Ensaio	P		t		Twen 80		Poloxamer		T	
	(Watts)		(min)		(g)		407 (g)		(°C)	
U1	-1	225	-1	4	-1	2	-1	2	+1	80
U2	+1	450	-1	4	-1	2	+1	4	-1	70
U3	-1	225	+1	8	-1	2	+1	4	-1	70
U4	+1	450	+1	8	-1	2	-1	2	+1	80
U5	-1	225	-1	4	+1	4	+1	4	+1	80
U6	+1	450	-1	4	+1	4	-1	2	-1	70
U7	-1	225	+1	8	+1	4	-1	2	-1	70
U8	+1	450	+1	8	+1	4	+1	4	+1	80

Onde P= potência; t= tempo e T= temperatura

Neste estudo foram preparadas duas fases para a formação da emulsão, uma oleosa contendo cera de abelha, OCV e α - tocoferol e a outra fase aquosa contendo água e tensoativo. A composição destas fases está descrita na Tabela 4, lembrando que a fase oleosa consiste em 5% do total da formulação.

Tabela 4. Quantidades de cada componente em suas respectivas fases, sendo o total da formulação igual a 200g.

Fase Oleosa	Fase Aquosa
- 4g Óleo de café verde (40%)	- Água (qsp)
- 0,5g α -tocoferol (5%)	- 4, 6 e 8g Tensoativo (2, 3 e 4%)
- 5,5g Cera de abelha (55%)	

Cada fase foi pesada e aquecida separadamente em agitador magnético com aquecimento modelo TE0851 (Tecnal, Brasil), conforme temperatura do planejamento. A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação magnética e temperatura constantes. A mistura formada foi levada ao alto cisalhamento em um ultra-turrax modelo T25 digital (IKA Works Inc, EUA) ou ao ultrassom em um desruptor de células DES500 (Unique Group, Brasil), pelo tempo e velocidade/potência conforme planejamentos. Em seguida as amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo.

Para os estudos do processo foram avaliados dois parâmetros: tamanho da partícula e o rendimento do processo. Para a determinação do tamanho das partículas foi utilizada a técnica de espalhamento de luz utilizando os equipamentos Beckman Coulter modelo LS 13320 (Beckman Coulter, EUA) e Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd, UK), para a análise das micro e nanopartículas, respectivamente. Uma pequena quantidade de amostra foi suspensa em etanol e água (1:10) sob agitação constante, em agitador magnético (TE0851, Tecnal, Brasil) para a obtenção do tamanho da partícula. O meio de dispersão etanol/água foi utilizado pois tanto a cera de abelha quanto o OCV são insolúveis em meio aquoso. O rendimento do processo foi determinado pela razão entre a massa das partículas obtidas e a massa das misturas iniciais, dados em porcentagem.

4.3.3. Preparo dos sistemas micro e nanoparticulados, com diferentes concentrações de óleo de café verde.

Após os testes preliminares para avaliar as variáveis do processo, foram escolhidas as condições para o preparo das micro e nanopartículas. Dessa forma, as condições encontradas no presente estudo que apresentaram os melhores resultados, para cada técnica de preparo, estão na Tabela 5.

Tabela 5. Condições escolhidas para a produção das micro e nanopartículas.

Partículas	Condições
Micropartículas (<i>spray congealing</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Vazão do ar de resfriamento: 1,5m³/min Vazão de dispersão: 4,5mL/min Temperatura: 4°C
Nanopartículas (microemulsão à quente)	<ul style="list-style-type: none"> Velocidade de alto cisalhamento: 16.000rpm Tempo: 5 minutos Tween 80: 2g Poloxamer: 4g Temperatura: 70°C

Nesta segunda etapa do desenvolvimento de processos foram realizados ensaios utilizando as condições escolhidas, porém variando a concentração de OCV presente nas formulações. Foram estudadas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% de OCV tanto para a produção das micro quanto das nanopartículas, conforme Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Composição no preparo das amostras para a formação das micropartículas.

Experimento	OCV	α -tocoferol	CA
M1	10% (5g)	2% (1g)	88% (44g)
M2	20% (10g)	2% (1g)	78% (39g)
M3	30% (15g)	2% (1g)	68% (34g)
M4	40% (20g)	2% (1g)	58% (29g)
M5	50% (25g)	2% (1g)	48% (24g)
Total formulação	50g		

Tabela 7. Composição no preparo das amostras para a formação das nanopartículas.

Experimento	Fase Oleosa	Fase Aquosa
N1	10% (1g) OCV 2% (0,2g) α -tocoferol 88% (8,8g) CA	3% (6g) Tensoativo (tween+poloxamer) Água qsp 200g (184g)
N2	20% (2g) OCV 2% (0,2g) α -tocoferol 78% (7,8g) CA	3% (6g) Tensoativo (tween+poloxamer) Água qsp 200g (184g)
N3	30% (3g) OCV 2% (0,2g) α -tocoferol 68% (6,8g) CA	3% (6g) Tensoativo (tween+poloxamer) Água qsp 200g (184g)
N4	40% (4g) OCV 2% (0,2g) α -tocoferol 58% (5,8g) CA	3% (6g) Tensoativo (tween+poloxamer) Água qsp 200g (184g)
N5	50% (5g) OCV 2% (0,2g) α -tocoferol 48% (4,8g) CA	3% (6g) Tensoativo (tween+poloxamer) Água qsp 200g (184g)
Total	5% (10g)	95% (190g)
Total Formulação	200g	

Após a formação da suspensão de nanopartículas, a mesma foi submetida a um processo de liofilização para a eliminação de todo o conteúdo de água, visando futuramente comparar o desempenho das micro e nanopartículas nas formas farmacêuticas finais.

4.3.4. Caracterização dos sistemas para escolha das melhores condições

- Tamanho de partícula: Foi utilizada a técnica de difração a laser, onde uma pequena quantidade de amostra foi suspendida em água e etanol (sob agitação constante) e a distribuição do tamanho de partícula obtida. Os equipamentos utilizados foram um LS 13320 (Beckman Coulter, EUA) e um Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) para a análise das micro e nanopartículas respectivamente.
- Teor de Umidade: foi determinado em balança com sistema de aquecimento por luz halógena modelo MB45 (OHAUS Corporation, EUA), onde aproximadamente 500mg de cada amostra foi utilizada e o teor de umidade foi determinado a uma temperatura de 105°C até peso constante. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de umidade fornecido em porcentagem.
- Densidade aparente e compactada: foi determinada através da prévia pesagem de uma proveta graduada, onde 1g de amostra foi adicionada e a proveta pesada novamente. A densidade aparente foi determinada através da razão entre a massa de amostra e o respectivo volume ocupado. A mesma proveta foi submetida a compactação manual até o volume permanecer constante e a densidade compactada foi determinada pela mesma razão entre massa e seu respectivo volume. Estes testes foram feitos em triplicata.
- Viscosidade: foram realizados estudos reológicos para verificar a viscosidade de cada sistema em sua fase líquida. As amostras foram colocadas em reômetro modelo R/S-CPS (Brookfield, Ltd, EUA) com sistema Peltier de controle de temperatura. As análises foram feitas em dois passos de um minuto, com 20 medições em cada passo, utilizando *spindle* CP 25 e 0,5g de amostra. No primeiro passo a taxa de

cisalhamento variou entre 0 e 200s⁻¹ e no segundo de 200 a 0s⁻¹. A temperatura da análise permaneceu constante a 80°C e foi utilizado um *gap* de 0,05mm. As análises foram feitas em triplicata.

- Teor de OCV presente nas partículas: foram realizados estudos cromatográficos (GC-MS 7890A, Agilent Technologies, EUA) para verificar o teor de ácido palmítico (AcP) nas amostras. Após caracterização e quantificação dos AGs contidos no OCV, o AcP foi escolhido para ser usado na curva analítica para quantificação do OCV nas micro e nanopartículas. O AcP é o segundo ácido graxo mais abundante no OCV e seu pico cromatográfico está livre de interferentes. Dessa forma, as micro e nanopartículas foram submetidas às reações de hidrólise e esterificação, conforme descrito no item 4.3.1, para então serem analisadas por cromatografia em fase gasosa. O teor de OCV foi calculado através da razão entre a concentração de AcP final encontrado por análise CG e a concentração de AcP inicialmente colocado para o preparo das micropartículas. Este cálculo foi feito utilizando a Equação 1.

$$\% \text{Teor} = \frac{[\text{AcP}]_{\text{final}}}{[\text{AcP}]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

4.3.5. Estudo de estabilidade oxidativa em diferentes proporções dos componentes das micro e nanopartículas

Para avaliar mais detalhadamente a influência das proporções dos componentes usados para a produção das micro e nanopartículas sobre características de estabilidade oxidativa do OCV foi realizado um planejamento de experimento com misturas do tipo “Simplex-Lattice” de grau 3 (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem dos componentes da mistura em cada amostra do planejamento (sendo 15g o peso total de cada mistura).

Amostra	CA (%)	OCV (%)	α-toc (%)
1	0,00	50,00	50,00
2	16,67	66,67	16,67
3	50,00	50,00	0,00
4	50,00	0,00	50,00
5	100,00	0,00	0,00
6	33,33	33,33	33,33
7	0,00	0,00	100,00
8	66,67	16,67	16,67
9	0,00	100,00	0,00
10	16,67	16,67	66,67

Para o preparo das amostras, as quantidades específicas de cada componente do planejamento foram devidamente pesadas, sempre totalizando 15g de mistura. A cera de abelha foi aquecida e após fusão da CA foram adicionados o OCV e o α -tocoferol, homogeneizando com bastão de vidro. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e então analisadas.

Com as misturas obtidas neste planejamento foram realizados estudos de estabilidade oxidativa por análises termogravimétricas e testes Rancimat.

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento Simultaneous DTA-TGA, modelo SDT2960 (TA Instrumens, EUA) sob atmosfera de gás oxigênio em fluxo de 100mL/min, em cadinho de platina, taxa de aquecimento de 10°C/min, desde a temperatura ambiente até 800°C. Foram pesadas cerca de 10mg das misturas contendo OCV, α -tocoferol e CA, conforme quantidades descritas no planejamento e colocadas diretamente no cadinho.

As análises em Rancimat®, modelo 873 (Metrohm, Suíça) foram determinadas a 110 °C e fluxo de gás de 20L/h, utilizando misturas contendo 3g de óleo de soja e 30mg de amostra, em quantidades de OCV, α -tocoferol e CA descritas no planejamento. O tempo de análise variou de acordo com o período de indução fornecido pelo equipamento para cada amostra. Este aparelho traça uma estimativa da estabilidade oxidativa através da passagem de um fluxo contínuo de oxigênio através da amostra, forçando a oxidação e arrastando produtos voláteis (provenientes das reações oxidativas) a outro recipiente contendo água e um eletrodo que determina a variação da condutividade da água. O período de indução, determinado automaticamente

por este equipamento, é o tempo necessário para se atingir um nível de rancidez detectável ou uma considerável mudança na taxa de oxidação (ARAUJO, *et al.*, 2010).

4.3.6. Reprodutibilidade do processo

Após os estudos do processo, descritos anteriormente nos itens 4.3.2.1 e 4.3.2.2 e da concentração dos componentes da mistura nos itens 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5, foram fixadas as condições para a produção das micro e nanopartículas assim como as porcentagens de cada componente.

Foram feitas amostras nessas condições em triplicata para garantir a reprodutibilidade do processo. Nessas condições, os parâmetros estudados foram tamanho de partícula e teor do OCV presente nas micro e nanopartículas, segundo método escrito no item 4.3.4.

4.3.7. Preparação dos hidrogéis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV

Foram avaliados 4 tipos de géis hidrofílicos para incorporação das micro e nanopartículas à base de CA e OCV: hidroxietilcelulose (natrosol[®]), carbopol[®], carboximetilcelulose (CMC) e aristoflex[®].

Em cada gel foi incorporado 10% de partículas, o que equivale aproximadamente a 5% de OCV e 0,5 % de α -tocoferol. Como o intuito do trabalho é comparar os sistemas micro e nanoparticulados com o OCV líquido, incorporou-se ao gel uma fase oleosa contendo cera de abelha (fundida à 70°C), OCV e α -tocoferol, nas mesmas concentrações usadas no processo de produção das partículas.

Nesta fase, as micro e nanopartículas foram adicionadas ao gel e homogeneizadas com o auxílio de um bastão de vidro. Já para a incorporação do OCV líquido, o tanto o gel quanto a porção oleosa (composta por OCV, α -tocoferol e CA) foram aquecidos, separadamente, à 60°C e depois misturadas e homogeneizadas com um bastão de vidro.

Para a escolha do melhor veículo, foram utilizados como parâmetros de avaliação a estabilidade por centrifugação e o tamanho de partículas.

O estudo de tamanho de partículas foi realizado conforme descrito no item 4.3.4. A avaliação da estabilidade preliminar foi realizada utilizando 5g de cada amostra e estas foram centrifugadas a 3000rpm por 30 minutos.

Nessa etapa, portanto, foram produzidos três hidrogéis: um contendo OCV líquido (L-OCV), outro contendo as micropartículas produzidas (M-OCV) e o terceiro contendo as nanopartículas (N-OCV).

4.3.8. Comparação entre os hidrogéis L-OCV, M-OCV e N-OCV

4.3.8.1. Estudo da Estabilidade Física

As formulações contendo OCV, M-OCV e N-OCV foram armazenadas por um período de 90 dias, sob controle de umidade ($75\pm 2\%$) e à temperatura de 25 e $40\pm 2^\circ\text{C}$. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias. As estabilidades físicas foram avaliadas pelo comportamento reológico e a aparência de cada formulação.

Para os estudos do comportamento reológico foram utilizados 0,5g de amostra, em reômetro do tipo cone placa modelo R/S-CPS (Brookfield, EUA), sob temperatura de 25°C , *spindle* CP 25, *gap* 0,05mm e taxa de cisalhamento crescente de 0 a 200s^{-1} e decrescente de 200 à 0s^{-1} .

4.3.8.2. Estudo da Estabilidade Química

Para os estudos de estabilidade química foram utilizados 0,5g de cada amostra armazenada segundo descrito no item 4.3.8.1.

As amostras coletadas foram derivatizadas e analisadas em cromatógrafo à gás, seguindo o mesmo procedimento e metodologia descritos no item 4.3.1 para quantificação do OCV.

Para avaliar a degradação do OCV em cada amostra, foi escolhido o ácido palmítico como marcador químico por estar presente em grandes quantidades e em um tempo de retenção distante de outros picos. As leituras foram realizadas em triplicatas e os resultados avaliados pela perda de massa deste ácido graxo, dada em porcentagem.

4.3.8.3. Letalidade em *Artemia salina*

Para esse ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982), com algumas modificações. Os ovos de *Artemia salina* foram cultivados em um aquário contendo água destilada e sal marinho (38 g/L). Durante as 48 horas de incubação, foi feito o controle da aeração, luz, temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e o pH foi mantido entre 8 e 9. Após esse período, os náuplios foram recolhidos com o auxílio de uma micropipeta e colocados em tubo de ensaio contendo 9mL de salina (38g/L). Os ensaios foram feitos em triplicata e em cada tubo foram adicionados 10 náuplios. Os géis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV foram solubilizadas em DMSO (1%), em concentrações finais de 10, 50, 100, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas em contato com as amostras, foi feita a contagem de náuplios sobreviventes.

4.3.8.4. Viabilidade Celular pelo Método XTT

A linhagem celular L929 derivado de fibroblastos murino foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Maria José Vieira Fonseca. As células foram cultivadas em meio D-MEM (Sigma-Aldrich[®]) com 10% de soro fetal bovino mantidas em incubadoras MCO-19AICUV-PA (Panasonic Corporation, Japão) sob atmosfera úmida com 4% de CO_2 a 37°C . O D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) é o meio padrão utilizado em culturas de células de mamífero. É comercializado como pó solúvel e deve ser dissolvido em água Milli-Q. Foi utilizada a formulação D-MEM com alta concentração de glicose (*high glucose*) suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado (SFB, HyClone[®]), 100 U/ml de penicilina (Life Technology), 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Life Technology), 3,7g/L de bicarbonato de sódio (Merck) e 2,4g/L de tampão HEPES (Sigma-Aldrich). O pH foi corrigido para 7,4. O meio foi esterilizado através do processo de filtração com poros 0,22 μm de diâmetro (NALGENE[®]) e armazenado a 4°C .

O ensaio citotóxico *in vitro* foi realizado utilizando o kit TOX2-1KT XTT based (Sigma-Aldrich[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, foram plaqueadas 4×10^4 células/poço em placas de 96 poços (Santa Cruz BiotechnologyTM) em um volume final de 200 μL de meio de cultura. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e substituído por

meio de cultura contendo a formulação hidrogel a ser testada. As amostras dos três géis foram diluídas em meio de cultura nas seguintes concentrações 125, 250, 500, 1000 e 2000mg/mL. Foram feitos controles positivos e negativos, onde para o controle positivo foi utilizado meio de cultura livre de formulação hidrogel e para o controle negativo células mortas com DMSO (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A viabilidade celular foi avaliada pela capacidade das enzimas das células viáveis em converter o XTT em derivados coloridos de formazan. Após 24 horas da adição de meio de cultura contendo as diferentes concentrações da formulação farmacêutica, absorvância foi medida em um comprimento de onda de 450nm utilizando espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA). Foram feitas triplicatas para cada diluição estudada e os valores foram encontrados conforme a Equação 2.

$$\text{Células Vivas} = \frac{(100 * \text{Abs})}{C^+} \quad (2)$$

Onde: Abs = média das absorvâncias das concentrações avaliadas

C⁺ = média das absorvâncias do controle positivo

4.3.8.5. Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* por espectrofotometria

As análises foram feitas seguindo a metodologia desenvolvida por Mansur *et al.* (1986), com algumas modificações. Os géis produzidos foram avaliados para observar uma possível diferença no fator de proteção solar do OCV quando este se apresenta na forma de micro ou nanopartículas.

Num balão volumétrico de 100mL foi pesado 0,5g de gel e foi adicionado uma solução de hexano e etanol (3:2) para solubilizar a amostra. Após total solubilização, o volume foi completado com etanol. Uma alíquota de 1,0mL foi tomada e transferida para um balão volumétrico de 25mL, etanol foi adicionado até completar o volume. Assim, obtendo uma concentração final de 0,2mg/mL. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis modelo M 330 Plus (Spectronic Camspec Ltd., Leeds, UK), em triplicata. Uma solução de hexano e etanol (3:2) foi utilizada como branco e as absorvâncias foram registradas em

comprimentos de onda entre 290 e 320nm. O FPS médio foi calculado pela Equação 3 (Mansur et al, 1986).

$$\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \cdot \text{EE}(\lambda) \cdot 2 \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda) \quad (3)$$

Onde:

FC = fator de correlação (igual a 10)

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ

Abs (λ) =absorbância encontrada para solução no comprimento de onda λ

Segundo Mansur *et al.* (1986), a relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda é dada por um fator de multiplicação, descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Fator de multiplicação em seu respectivo comprimento de onda, segundo Mansur et al, 1986.

λ (nm)	EE (λ) . I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,0000

4.3.8.6. Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere®)

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das amostras foi determinada em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração, modelo UV2000-S (Labsphere, EUA) obtendo os seguintes parâmetros: fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ). Foram utilizadas placas comerciais de polimetilmetacrilato como substrato sintético. Sobre o

substrato foram pesadas 50mg de amostra e espalhadas uniformemente na superfície da placa, em movimentos circulares com o intuito de formar um filme fino. Os registros dos valores foram realizados em intervalos de comprimento de onda entre 250 e 450nm, com taxa de progressão de 1nm. Os valores de funcionalidade estimada das amostras foram calculadas pelo próprio software do equipamento (Labsphere® UV-2000 *Application* versão 1.1.1.0, EUA).

Para a avaliação da eficácia das amostras, foram utilizados os valores espectrofotométricos de transmitância obtidos e matematicamente tratados antes e após a etapa de irradiação das amostras em câmara de fotoestabilidade por duas horas, com irradiância de 55 W/m², dose total de 4177 kJ/m² e temperatura controlada, evitando o superaquecimento das mesmas. A fotoestabilidade foi avaliada por meio da comparação dos valores espectrofotométricos de transmitância obtidos antes e após a irradiação.

4.3.8.7. Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro*

O estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* foi realizado utilizando o método de célula de difusão vertical. O modelo de Célula de Franz tem sido o mais utilizado, que consiste em dois compartimentos (doador e receptor) separados por uma membrana. No caso do presente estudo, foi utilizada pele de orelha de porco devidamente dissecada, uma vez que esta apresenta propriedades semelhantes à pele humana.

Primeiramente, as orelhas de porco recém-abatidas foram dissecadas, removendo os tecidos subcutâneos. Foram utilizadas células com uma área de difusão de 1,77cm², as peles foram colocadas com o estrato córneo voltado para o compartimento doador (onde a formulação foi aplicada) e a derme para o compartimento receptor. Em cada célula foram adicionados 0,5g de amostra na superfície do estrato córneo. Foi utilizado tampão fosfato (pH=7,2) como solução receptora e este foi mantido a uma temperatura constante de 37±0,5°C sob contínua agitação.

Foram coletadas alíquotas de 1,5mL do fluído receptor nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Após cada coleta o meio foi resposto com o devido volume, sempre monitorando a presença de bolhas abaixo da membrana.

Após as 12 horas, as formulações foram removidas e o estrato córneo foi separado da derme por *tape stripping*. As fitas foram colocadas em 5mL de metanol e levadas ao vórtex por 3 minutos. Já a epiderme e a derme foram cortadas e trituradas em turrax à 10.000rpm por 1 minuto e posteriormente levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos à 5.000rpm e o sobrenadante foi derivatizado (conforme metodologia descrita no item 4.3.1) para posterior análise.

As alíquotas foram derivatizadas, conforme metodologia descrita no item 4.3.1, para que os ácidos graxos se transformarem em sua forma livre e assim serem quantificados por cromatografia gasosa.

4.3.8.8. Avaliação clínica dos efeitos hidratantes das formulações

O estudo clínico de eficácia hidratante foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Protocolo CEP - FCFRP nº 315). As voluntárias (n=10) participantes foram primeiramente orientadas sobre os objetivos e métodos do estudo e selecionadas seguindo alguns critérios tais como faixa etária entre 19 e 39 anos, não estar grávida ou amamentando e não apresentar lesões na pele. A região escolhida para o estudo foi o antebraço direito e esquerdo, onde cada lado foi dividido em duas regiões. Foram adicionados 20µL de cada amostras nas regiões determinada e espalhadas em movimentos circulares uniformes. As amostras foram posicionadas da seguinte forma: Antebraço esquerdo, porção superior = Gel L-OCV; Antebraço esquerdo, porção inferior = Controle (porção sem amostra); Antebraço direito, porção superior = Gel N-OCV; Antebraço direito, porção inferior = Gel M-OCV, conforme Figura 10.

Figura 10. Posições no antebraço onde foram aplicadas as formulações e realizadas as medições.

Para a determinação do conteúdo aquoso foram realizadas 5 medidas em cada região estudada, utilizando o equipamento Corneometer[®] CM 825 (Courage-Khazaka, Alemanha).

O estudo de perda transepidérmica de água foi realizado utilizando o equipamento Tewameter[®] (Courage-Khazaka, Alemanha), que tem como função medir a evaporação de água da superfície da pele. Este estudo é baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick em 188 e os valores dados em $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, conforme Equação 4 (MERCURIO, 2012).

$$\frac{dm}{dt} = - D.A. \frac{dp}{dx} \quad (4)$$

Onde:

dm/dt = fluxo de difusão

A = área

Dc/dx = alteração da concentração por distância

D = coeficiente de difusão de vapor de água no ar

Após aproximadamente 20 segundos de contato entre a sonda do equipamento e a pele da voluntária, obtêm-se o valor médio de TEWL. As medidas foram realizadas em triplicata com as mesmas voluntárias e nas mesmas condições do estudo de determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, anteriormente descrito.

Para a análise estatística dos estudos clínicos foi utilizado o teste de Wilcoxon Pareado que tem como objetivo comparar o desempenho de pares de amostras no sentido de verificar se existem diferenças significativas. Este teste substitui o t de Student para amostras pareadas em método não-paramétrico. A eficiência do teste de Wilcoxon é de cerca de 95%, tanto para pequenas quanto para grandes amostras (STEDEFELDT, *et al.*, 2013).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do óleo de café verde

Após a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, seguindo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa. A Figura 11 mostra o cromatograma obtido para o OCV.

Figura 11. Cromatograma do óleo de café verde. Onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem respectivamente aos ácidos palmítico, linoléico, oleico, esteárico e araquídico.

A identificação e quantificação dos picos foram feitas por espectrometria de massa, utilizando como base de dados a biblioteca NIST 11 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technologies, EUA). Este método

identifica os diferentes átomos que compõe uma substância, através do bombardeamento de uma substância com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. A identificação e caracterização estrutural dos compostos em espectrometria de massa em geral, dependem da medição da massa do íon precursor, que será relacionada com uma molécula de forma conhecida (MCLUCKEY; MENTINOVA, 2011). Segundo esta análise, os principais picos encontrados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Principais ácidos graxos encontrados por cromatografia gasosa no OCV.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Ácidos graxos*	Área (%)
1	10.121	ácido palmítico	28,74
2	12.108	ácido linoléico	42,77
3	12.153	ácido oleico	12,51
4	12.456	ácido esteárico	10,62
5	15.850	ácido araquídico	3,57

*Outros ácidos graxos foram encontrados em quantidades mínimas totalizando 1,79%.

Os resultados obtidos na caracterização do OCV estão de acordo com aqueles descritos anteriormente em literatura por Maier, Mätzel (1982), Folstar (1985), Wagemaker (2011) e D'Amelio *et al.* (2013). Na Tabela 11 estão os valores encontrados nestes estudos.

Tabela 11. Porcentagens descritas em literatura dos ácidos graxos presentes no OCV.

Ácido Graxo (%)	Folstar (1985)	Wagemaker (2011)	D'Amélio <i>et al.</i> (2013)
Ácido Palmítico	35,2 a 36,7	30,2	27,6
Ácido linoleico	41,2 a 42,6	46,3	47,47
Ácido oleico	9,5 a 11,9	10,6	9,21
Ácido esteárico	7,2 a 9,7	8	9,01
Ácido araquídico	0,3 a 1,5	2,3	4,05
Ácido linolênico	1,3 a 2,7	1,6	1,48

Segundo D'Amélio *et al.* (2013) a análise por RMN-AR poderia ser uma alternativa para a caracterização do OCV que descarta a necessidade de reações químicas prévias. No entanto, devido à complexidade do perfil de ácidos graxos presentes no OCV esta abordagem não pode ser considerada como uma alternativa para a cromatografia em fase gasosa. Em seu estudo comparativo, D'Amélio *et al.* (2013) verificou que utilizando CG foram

identificados e quantificados 8 ácidos graxos, enquanto que para a análise por RMN-AR apenas 3 ácidos graxos foram identificados.

Algumas alterações nas proporções de ácidos graxos podem ocorrer tanto por questões ambientais tais como solo e clima quanto por processos de colheita e pós-colheita. (D'Amelio *et al.*, 2013).

As Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 mostram os respectivos espectros de massa obtidos para os principais picos identificados.

Figura 12. Comparação entre os espectros de massa do pico 1 (ácido palmítico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 13. Comparação entre os espectros de massa do pico 2 (ácido linoléico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 14. Comparação entre os espectros de massa do pico 3 (ácido oleico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 15. Comparação entre os espectros de massa do pico 4 (ácido esteárico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 16. Comparação entre os espectros de massa do pico 5 (ácido araquídico) obtido no OCV com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

A Figura 17 mostra o cromatograma obtido na análise de alguns padrões de ácidos graxos, com este podemos observar que os tempos de retenção para os padrões foram próximos aos encontrados no OCV.

Figura 17. Cromatograma de alguns padrões de ácidos graxos. Onde os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem respectivamente aos ácidos mirístico, palmítico, esteárico, araquídico e beénico.

As Figuras 18, 19, 20, 21 e 22 correspondem aos espectros de massa obtidos para os picos dos ácidos mirístico, palmítico, esteárico e araquídico, respectivamente.

Figura 18. Comparação entre os espectros de massa do pico 1 (ácido mirístico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 19. Comparação entre os espectros de massa do pico 2 (ácido palmítico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 20. Comparação entre os espectros de massa do pico 3 (ácido esteárico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 21. Comparação entre os espectros de massa do pico 4 (ácido araquídico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Figura 22. Comparação entre os espectros de massa do pico 5 (ácido beênico) do cromatograma dos padrões com o encontrado na biblioteca (NIST 11 Mass Spectral Library), respectivamente.

Foi feita uma curva de calibração utilizando o padrão de ácido palmítico. No OCV este ácido graxo é encontrado em grande quantidade (cerca de 28%), não é o mais abundante, porém seu peso molecular permite a visualização do pico sem interferência de outro ácido graxo, como acontece para o ácido linoléico e oleico que apresentam tempos de retenção muito próximos.

A curva de calibração do ácido palmítico está representada na Figura 23, onde o coeficiente de linearidade (R^2) corresponde à 0,9942.

Figura 23. Curva analítica para o ácido palmítico.

O ácido palmítico foi escolhido como “marcador” para ser quantificado nos testes de eficiência de encapsulação e estabilidade, bem como em outras análises que forem quantificadas por cromatografia gasosa.

5.2. Estudo do processo para o preparo das micro e nanopartículas contendo OCV

5.2.1. Micropartículas

O tamanho das micropartículas preparadas por *spray congealing* variou entre 63,63 e 101,2 μ m e o rendimento variou entre 42,0 e 54,7%, conforme a Tabela 12. Estes valores podem não ser considerados ideais para aplicação tópica por alguns autores como Martins (2014) e Turssili *et al.*(2007), que consideram ótima a faixa entre 10 e 50 μ m. No entanto, a ausência de trabalhos sobre a formação de sistemas lipídicos microparticulados contendo óleos vegetais como ativos impedem uma discussão mais detalhada sobre esse parâmetro.

Recentemente a microencapsulação do OCV tem sido estudada, porém esta foi feita por *spray dryer* formando partículas menores, com diâmetros entre 10 e 16 μ m. No entanto, o conteúdo de OCV nas partículas é de apenas 15% com relação à quantidade de sólidos totais (SILVA, VIEIRA, HUBINGER, 2014).

Tabela 12. Valores obtidos para o tamanho e rendimento das micropartículas

Ensaio	T (°C)	VD (mL/min)	VAR (m ³ /min)	Rend (%)	Tam (μ m)
1	-4	4,5	1,0	45,5	71,55
2	+4	4,5	1,0	42,8	72,60
3	-4	9	1,0	53,9	67,97
4	+4	9	1,0	45,7	85,40
5	-4	4,5	1,5	51,2	101,2
6	+4	4,5	1,5	54,7	63,63
7	-4	9	1,5	42,0	75,60
8	+4	9	1,5	52,2	63,85

De acordo com a análise de variância não houve diferença significativa entre os valores obtidos para estes parâmetros nas condições estudadas,

sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. Porém, as condições do experimento número 6 se mostraram mais interessantes, uma vez que apresentou o melhor rendimento com o menor tamanho de partícula.

Para a escolha do diâmetro mais apropriado deve-se considerar, além do tamanho da partícula, a composição da matriz e em qual camada da pele este ativo deverá ser liberado. Todas as micropartículas produzidas apresentaram tamanhos superiores a $10\mu\text{m}$, sugerindo que provavelmente não serão capazes de penetrar a pele (TOLL *et al.*, 2004 e SCHAEFER *et al.*, 1990). A permanência do ativo na superfície da pele pode ser interessante para formulação de protetores solares. Serão realizados estudos de permeação e retenção cutânea para identificar em qual camada o OCV- α será liberado. A escolha das menores micropartículas para serem estudadas posteriormente pode ser justificada pelo fato de que, em geral, formulações contendo partículas com diâmetros menores tendem a ser fisicamente mais estáveis (BRUXEL *et al.*, 2012).

5.2.2. Nanopartículas

As tabelas 13 e 14 apresentam os valores obtidos para o tamanho das nanopartículas produzidas por ultra-turrax e ultrassom que variaram entre 249,2nm e 7664nm.

Tabela 13. Tamanho das nanopartículas obtidas por homogeneização em ultra-turrax

Ensaio	V (rpm)	t (min)	Twen 80 (g)	Poloxamer 407 (g)	T (°C)	Tam (nm)
T1	8.000	5	2	2	80	7664
T2	16.000	5	2	4	70	249,2
T3	8.000	20	2	4	70	5826
T4	16.000	20	2	2	80	287,6
T5	8.000	5	4	4	80	3920
T6	16.000	5	4	2	70	280,6
T7	8.000	20	4	2	70	6554
T8	16.000	20	4	4	80	253,6

Onde V= velocidade; t= tempo e T= temperatura

Tabela 14. Tamanho das nanopartículas obtidas por homogeneização em ultrassom

Ensaio	P (Watts)	t (min)	Twen 80 (g)	Poloxamer 407 (g)	T (°C)	Tam (nm)
U1	225	4	2	2	80	482,6
U2	450	4	2	4	70	806
U3	225	8	2	4	70	499,2
U4	450	8	2	2	80	606
U5	225	4	4	4	80	669
U6	450	4	4	2	70	966,6
U7	225	8	4	2	70	421,2
U8	450	8	4	4	80	400,2

Onde P= potência; t= tempo e T= temperatura

Como podemos observar os ensaios T1, T3, T5 e T7 apresentaram tamanhos maiores que 1 μ m. Esses quatro ensaios foram realizados em rotações de 8.000rpm, talvez essa rotação não gere uma energia suficientemente alta para deformar a partícula e reduzir o seu tamanho para uma escala nanométrica (KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010).

O ultrassom é um fenômeno físico capaz de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases (cavitação). (MARTINES; DAVOLOS; JAFELICCI, 2000), porém nas condições estudadas não foi capaz de produzir partículas menores que 400nm. Conforme os dados da tabela 13 os ensaios U2, U4, U5 e U6 apresentaram tamanhos maiores que 500nm.

De uma maneira geral, seguindo as condições do presente estudo, o ultra-turrax foi capaz de formar partículas menores do que o ultrassom.

Essas partículas com tamanhos maiores não são consideradas interessantes para o presente estudo, uma vez que o intuito foi formar partículas menores que 1 μ m (DIMA, DIMA, IORDACHESCU, 2015). Além disso, houve separação de fases em alguns ensaios do planejamento, tanto para a homogeneização por ultra-turrax quanto por ultrassom. Dessa forma, as condições que não apresentaram separação de fases e mostraram um tamanho de partícula considerado adequado, foram àquelas observadas nos ensaios T2 e U8 realizados no ultra-turrax e no ultrassom, respectivamente.

No entanto, foram realizados novos testes para verificar se a utilização do ultra-turrax seguido do ultrassom produziriam partículas ainda menores. Sendo assim, foram selecionadas as condições realizadas no ensaio T2 do

ultra-turrax e em seguida um novo planejamento experimental foi realizado variando o tempo e a potência do ultrassom (Tabela 15).

Tabela 15. Planejamento experimental e o tamanho das partículas obtidas em cada ensaio

Ensaio	Potência (Watts)	Tempo (min)	Tamanho (nm)
TU1	450	4	319,3
TU2	450	8	370,9
TU3	225	4	367,0
TU4	225	8	347,0

Conforme observado na Tabela 15, o uso do ultrassom após a homogeneização por ultra-turrax aumentou o tamanho das partículas, podendo ter ocorrido coalescência das partículas. Dessa forma, podemos observar que dentro das condições do presente estudo, a homogeneização por ultra-turrax se mostrou mais eficiente para a formação destas nanopartículas.

Para avaliar a reprodutibilidade deste método, foram feitos testes em triplicata nas condições do ensaio T2, conforme mostra a Tabela 16.

Tabela 16. Tamanho das nanopartículas produzidas seguindo as condições do ensaio T2.

Exp	Tamanho
T2.1	273,1
T2.2	247,2
T2.3	288,3
Desvio	16,97
Média	269,5
CV	0,063
CV%	6,3

Como podemos observar o coeficiente de variação mostrou uma baixa dispersão dos resultados (6,3%), indicando que as condições escolhidas foram reprodutíveis.

O tamanho ideal para as nanopartículas pode variar de acordo com o ativo e/ou matriz utilizada. Taveira (2009) demonstrou que as partículas contendo doxorubicina com diâmetro médio de 175nm e 278nm apresentaram tamanho adequado no seu estudo de tratamento tópico do câncer de pele. Por

outro lado, Vaghasyia *et al.* (2013) considera que nanopartículas lipídicas sólidas podem apresentar tamanhos entre 50nm e 1000nm, porém determinaram ótimas as partículas contendo cloridrato de terbinafina que apresentaram um diâmetro de 300nm.

Sendo assim, para a produção das nanopartículas as condições propostas no ensaio T2 do ultra-turrax se mostraram mais interessantes, uma vez que apresentou um tamanho adequado de partículas, não houve separação de fases e foi considerado reprodutível.

5.3. Preparo e caracterização dos sistemas micro e nanoparticulados, com diferentes concentrações de óleo de café para escolha das melhores condições.

Após a definição das melhores condições do processo, foram estudadas diferentes concentrações de OCV presentes nas amostras para então decidir a melhor formulação. Neste estudo variamos a concentração deste óleo em 10, 20, 30, 40 e 50%.

Para os estudos de caracterização as nanopartículas foram liofilizadas para poderem ser comparadas com as micropartículas, onde neste caso, o processo de produção já fornece as partículas sólidas em forma de pó.

Para verificar a melhor formulação os parâmetros estudados foram: rendimento, tamanho de partícula, teor de umidade, densidade aparente e compactada, viscosidade e teor de OCV. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t-Student pareado. A Tabela 17 e 18 mostram os resultados obtidos para as micro e nanopartículas, respectivamente.

Tabela 17. Resultados da caracterização das micropartículas

Exp.	OCV (%)	α -toc (%)	CA (%)	R (%)	Tam (μ m)	U (%)	DA (g/mL)	DC (g/mL)	Vis (Pa.s)	Teor (%)
M1	10	2	88	43,1	40,87	0,51	0,13	0,26	3,23	93,4
M2	20	2	78	42,7	40,82	0,52	0,12	0,25	3,89	87,3
M3	30	2	68	55,5	44,15	0,65	0,13	0,25	3,59	92,3
M4	40	2	58	52,5	57,72	0,76	0,11	0,25	3,77	86,7
M5	50	2	48	58,0	78,98	0,66	0,11	0,27	3,61	95,6

Tabela 18. Resultados da caracterização das nanopartículas

Exp.	OCV (%)	α -toc (%)	CA (%)	R (%)	Tam (η m)		U (%)	DA (g/mL)	DC (g/mL)	Vis (Pa.s)	Teor (%)
N1	10	2	88	96,8	361,3*	1506**	0,69	0,10	0,23	0,27	85,5
N2	20	2	78	97,8	279,6*	1677**	0,12	0,10	0,24	0,84	85,3
N3	30	2	68	96,6	245,3*	1921**	0,18	0,10	0,25	0,30	95,5
N4	40	2	58	97,3	246,7*	792,3**	0,27	0,10	0,27	0,52	88,4
N5	50	2	48	96,9	237,2*	696**	0,19	0,10	0,29	0,60	87,4

* Tamanho das nanopartículas em suspensão

** Tamanho das nanopartículas após liofilização

No caso das micropartículas produzidas por *spray congealing*, as variáveis que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), segundo tratamento estatístico, foram a densidade aparente e a densidade compactada, conforme os Figuras 24 e 25.

Figura 24. Densidade aparente das micropartículas. Houve diferença significativa entre: 10x40% ($p = 0,0377$)

Figura 25. Densidades compactadas das micropartículas. Houve diferença significativa entre: 10x30% ($p= 0,0001$); 10x50% ($p= 0,0377$); 30x50% ($p= 0,0153$).

Para as nanopartículas liofilizadas, os parâmetros estudados que apresentaram diferença significativa foram a umidade, a densidade compactada e a viscosidade, conforme os Figuras 26, 27 e 28.

Figura 26. Teor de umidade das nanopartículas liofilizadas. Houve diferença significativa entre: 10x20% ($p= 0,0254$); 10x30% ($p= 0,0147$); 10x40% ($p= 0,0081$); 10x50% ($p= 0,0117$).

Figura 27. Densidade compactada das nanopartículas liofilizadas. Houve diferença significativa entre: 10x30% ($p=0,0153$); 10x40% ($p=0,0051$); 10x50% ($p=0,0001$); 20x50% ($p=0,0377$); 30x50% ($p=0,0099$).

Figura 28. Viscosidade das nanopartículas liofilizadas. Houve diferença entre: 10x20% ($p=0,0153$); 10x40% ($p=0,0221$); 10x50% ($p=0,0486$); 20x30% ($p=0,0067$); 20x40% ($p=0,0143$); 20x50% ($p=0,0112$); 30x40% ($p=0,0491$); 30x50% ($p=0,0042$).

De uma maneira geral, com relação ao teor de umidade, todas as amostras apresentaram baixa umidade, o que garante uma maior estabilidade para o material seco. O teor de umidade é um indicador de qualidade de materiais secos, sendo aceitos, de uma maneira geral, teores abaixo de 5%. Nestas condições, há uma diminuição significativa do crescimento microbiano e

das reações de degradação, promovendo maior estabilidade (PAGLIARUSSI; BASTOS; FREITAS, 2006).

Os rendimentos variaram entre cerca de 42 a 58% para as micropartículas e 96 a 97% para as nanopartículas. Apesar dos valores de rendimento para as micropartículas serem aparentemente baixos, são considerados bons quando se pensa em escala laboratorial. Nos equipamentos de *spray congealing* de pequena escala podem ocorrer adesão das partículas na câmara e também a perda de partículas pequenas pelo fato do ciclone de separação não ser capaz de prendê-las (ELKORDY; ESSA, 2010).

O teor de OCV variou entre 86,7% e 95,6% para as micropartículas e 85,3% e 95,5% para as nanopartículas. Estes resultados para as nanopartículas podem ser considerados aceitáveis uma vez que segundo Marcato (2009) dependendo da solubilidade do ativo na matriz lipídica, a capacidade de encapsulamento das nanopartículas lipídicas sólidas pode variar entre 25 e 50%. Outros autores também encontraram valores altos, como HOULI, et al (2009) na produção de NLS de quercetina (cerca de 91%), SUN, et al (2013) também conseguiu partículas contendo 90% de curcumina e VIJAYAN, et al (2013) produziu nanoestruturas contendo 82% de óleo de Neem.

Em média, os valores encontrados para o teor de OCV nas micropartículas estão de acordo com os resultados de Passerini *et al.* (2003). No referido estudo os autores produziram micropartículas contendo verapamil por “*spray congealing*”, onde as porcentagens variaram entre 49% e 101%. Tais valores, relativamente baixos, foram explicados devido a natureza hidrofílica do ativo, sendo melhorada após adição de tensoativos.

Existem várias aplicações para o OCV, como por exemplo, o uso em protetores solar, antienvelhecimento e anticelulite (D’AMELIO, *et al.*, 2013; WAGEMAKER, *et al.*, 2015; CHIARI, *et al.*, 2014). Dessa forma, diferentes tamanhos de partículas poderão ser usadas, dependendo do local onde o ativo deverá ser liberado (DIMA, DIMA, IORDACHESCU, 2015). Os diferentes tamanhos de partículas podem ser úteis para se obter uma ação superficial ou nas camadas mais profundas da pele. No presente estudo foram obtidas partículas de tamanho micro e nanométricas, que serão posteriormente estudadas para verificar a permeação e retenção cutânea. Sendo assim, os

tamanhos das partículas foram considerados adequados para o estudo, uma vez que o objetivo do presente trabalho é comparar sistemas micro e nanoparticulados com o OCV em sua forma líquida original.

Para verificar que não houve alteração no tamanho das micropartículas devido a utilização de uma pequena quantidade de etanol utilizada para a dispersão das mesmas em água, foi realizada outra análise onde as micropartículas foram suspensas em água e tensoativo (0,5%). Este estudo foi feito com micropartículas contendo 50% de OCV, e o resultado obtido para o diâmetro médio foi 80,41 μ m, concluindo assim que a pequena quantidade de etanol usado na suspensão destas partículas muito provavelmente não interfere em seu tamanho, uma vez que nessas condições o diâmetro médio encontrado na suspensão água/etanol foi de 78,98 μ m.

A densidade aparente e compactada e a viscosidade são fatores que podem influenciar na produção da formulação final, pois de uma maneira geral, quanto maior for a densidade do material maior sua velocidade de sedimentação quando em suspensão. Dessa forma, o conhecimento desses valores será de fundamental importância para os estudos futuros.

5.4. Estudo do planejamento com misturas

Nos estudos anteriores para as concentrações de OCV e alfa tocoferol, parâmetros importantes como teor de OCV, tamanho de partícula e rendimento indicaram valores próximos para as diferentes concentrações, sem alterações expressivas. Além disto, resultados anteriores de Nosari (2012) sugerem um sinergismo entre o OCV e cera de abelha em relação à sua atividade antioxidante. Dessa forma, um estudo mais detalhado das concentrações de OCV, alfa tocoferol e cera de abelha foi idealizado para verificar a melhor proporção desses componentes na mistura. Nessa nova etapa foi feito um planejamento de misturas usando como parâmetro a estabilidade oxidativa, com intuito de saber se há sinergismo ou antagonismo entre os componentes.

Para avaliar a estabilidade oxidativa foram feitos testes Rancimat e estudos termogravimétricos. Nos estudos termogravimétricos, avalia-se principalmente a temperatura de início da perda de massa ou degradação, e a perda de massa total até 400°C. A Figura 29 apresenta as curvas de TG das

amostras dos componentes puros que foram usados no planejamento de misturas, e portanto, correspondem à cera de abelhas, α -toc e OCV, ou experimentos 5, 7 e 9 da Tabela 19, respectivamente.

Figura 29. Curvas termogravimétricas das amostras dos componentes puros do planejamento de misturas.

Como podemos observar na Figura 29 e nos dados da Tabela 19, apesar de não apresentar diferenças significativas para os resultados, nessas condições o OCV obteve a melhor estabilidade oxidativa, com uma temperatura inicial de perda de massa - T_{IO} - de 195°C, maior que as demais, que foram de 188 e 183°C, para a cera de abelhas e o α -toc, respectivamente. Por outro lado, a massa de mistura restante a 400°C, M_R , também é usada como um indicador da estabilidade oxidativa. Como é possível verificar na Tabela 19, os valores para os compostos puros demonstram que as perdas de massa variaram de 75,12 a 94,37%. O componente da mistura que contribuiu para maior diminuição de perda de massa foi o OCV pois com a adição deste componente isoladamente a massa restante foi de 24,88%. Em seguida a cera de abelhas permitiu que 6,87% da massa inicial permanecessem a 400°C e para o α -toc, restou 5,63% da massa.

Tabela 19. Resultados para os testes de estabilidade oxidativa.

Amostra	CA (%)	OCV (%)	α -toc (%)	M_R % (400°C)	T_{IO} (°C)	σ (μ S/cm)
on1	0,00	50,00	50,00	17,35	190	102,5
2	16,67	66,67	16,67	16,16	190	185,0
3	50,00	50,00	0,00	15,8	179	185,5
4	50,00	0,00	50,00	6,57	172	35,5
5	100,00	0,00	0,00	6,87	188	62,0
6	33,33	33,33	33,33	12,61	172	58,0
7	0,00	0,00	100,00	5,63	183	9,5
8	66,67	16,67	16,67	7,4	161	82,5
9	0,00	100,00	0,00	24,88	195	187,3
10	16,67	16,67	66,67	15,58	197	10,0

O planejamento de misturas adotado, Simplex Lattice de ordem 3, permite verificar se os efeitos individuais dos componentes são realmente importantes ou significantes, bem como permite também verificar se existe alguma interação entre os componentes do tipo sinergismo ou antagonismo. A Figura 30 apresenta os dados obtidos com o planejamento de misturas na forma de mapa topográfico. O gráfico da Figura 30A representa os dados de T_{IO} e na Figura 30B apresentam-se os resultados de M_R .

Figura 30. Representação topográfica dos dados de estabilidade térmica oxidativa termogravimétricos no planejamento com misturas. **A)** Temperatura inicial de perda de massa, T_{IO} e; **B)** Percentual restante da massa inicial do experimento, M_R .

Na análise dos experimentos do planejamento de misturas, obtém-se para a variável perda de massa a 400°C o modelo quadrático com R² de 0,8851 representado pela Equação 5:

$$M_R\% = 6,275(\pm 3,055).CA\% + 24,058(\pm 3,055).OCV\% + 7,237(\pm 3,0555).\alpha\text{-toc}\% - 4,539(\pm 14,079).CA\%.OCV\% + 1,904(\pm 14,079).CA\%.\alpha\text{-toc}\% + 8,648(\pm 14,079).OCV\%.\alpha\text{-toc}\% \quad (5)$$

A análise de variância com o programa Minitab v.15 (Minitab Inc, PA, EUA) indicou que somente os efeitos lineares são significantes, ou seja, as influências dos componentes puros CA%, OCV% e α -toc% são significantes sobre a massa final de produto a 400°C, com $p = 0,0240$. É possível confirmar isto na Equação 5, onde além dos valores dos coeficientes do modelo estão também indicados as estimativas dos erros padrões, que demonstram claramente que as interações tem efeitos muito pequenos comparados com os erros. O efeito mais importante, demonstrado pelo valor do coeficiente e pela sua comparação com a estimativa de erro é o do OCV, de 24,058% para $\pm 3,055\%$. Portanto, se conclui que os maiores teores de OCV na mistura proporcionaram maior estabilidade quanto a M_R . Este efeito é visível na representação topográfica da região de misturas da Figura 30B.

Em relação ao T_{IO} , a análise de variância do modelo foi feita no mesmo programa e resultou no ajuste da Equação 6, com R² de 0,5628. Neste caso, apesar da representação topográfica da Figura 30A indicar uma tendência de aumento de T_{IO} para as regiões com maior teor de OCV, a análise de variância resultou em nenhum efeito, linear ou quadrático, como sendo significativa a 5%.

$$T_{IO} = 183,62(\pm 11,06).CA\% + 196,26(\pm 11,06).OCV\% + 187,89(\pm 11,06).\alpha\text{-toc}\% - 61,05(\pm 50,99).CA\%.OCV\% - 57,78(\pm 50,99).CA\%.\alpha\text{-toc}\% + 11,50(\pm 50,99).OCV\%.\alpha\text{-toc}\% \quad (6)$$

Nas análises Rancimat a avaliação da estabilidade oxidativa é feita através dos “períodos de indução” fornecidos pelo equipamento, que é o tempo requerido para a taxa de oxidação da amostra aumentar abruptamente. No entanto, o Rancimat é originalmente aplicado para avaliar a oxidação dos óleos

isoladamente (puros). Em nosso experimento, foram adicionadas as misturas de OCV, α -toc e cera de abelhas ao óleo de soja, e verificada a taxa de geração de produtos de oxidação ou o quanto as misturas inibem a oxidação do óleo de soja. Algumas das misturas, em especial as que continham grandes quantidades de cera de abelhas não apresentaram o ponto de mudança na taxa de oxidação, como pode ser visto na Figura 31A e, portanto, não forneceram o valor de tempo de indução. Levando isto em consideração, foram usados os valores de condutividade anotados após 7 horas de experimento como indicador da ação inibitória da oxidação do óleo de soja. Os resultados estão descritos na Tabela 19. A Figura 31A apresenta um gráfico da evolução da condutividade no meio receptor para o experimento 5 do planejamento, quando se possui a cera de abelhas pura adicionada ao óleo de soja. Os resultados das condutividades após 7 horas para todos os experimentos foi representada na forma topográfica na Figura 31B. Estes dados também foram analisados com o programa Minitab v15, resultando no ajuste do modelo representado pela Equação 7, com R^2 de 0,9168.

$$\begin{aligned} \sigma \text{ (}\mu\text{S/cm)} = & 64,89(\pm 29,66).CA\% + 200,67(\pm 29,66).OCV\% + \\ & 4,94(\pm 29,66).\alpha\text{-toc}\% - 182,84(\pm 136,67).CA\%.OCV\% - 97,42(\pm 136,67).CA\%. \\ & \alpha\text{-toc}\% + 59,07(\pm 136,67).OCV\%.\alpha\text{-toc}\% \end{aligned} \quad (7)$$

A análise de variância feita no Minitab v15 indicou que os termos lineares da regressão (Equação 7) foram significantes com $p = 0,021$. Os termos quadráticos não significantes indicam que não houve interação entre os componentes da mistura. Observando-se os valores dos coeficientes lineares e os erros padrões apresentados na Equação 7, podemos ver que o maior efeito é observado para o OCV, ou seja, quanto maior o teor de OCV na mistura, maior a taxa de aumento da condutividade, demonstrando que mistura oxida mais rapidamente. Este efeito é muito significativo pela observação dos valores do coeficiente (200,67 $\mu\text{S/cm}$), comparado com o erro padrão ($\pm 29,66 \mu\text{S/cm}$). Os efeitos de $CA\%$ e $\alpha\text{-toc}\%$ são bem menos importantes quando se usa este critério da análise.

Figura 31. Resultados dos testes Rancimat modificados, usando como indicador a condutividade no meio receptor após 7 h de experimento.

Na Figura 31B é possível notar que os valores de condutividade são maiores para regiões com maior teor de OCV e menores para as regiões com maior teor de α -toc.

Conforme outros estudos, os ácidos graxos poli-insaturados são mais propensos a oxidação, segundo Miyashita; Tagagi (1986) e Souza *et al.* (2004), a perda de massa nos óleos pode ser caracterizada em três eventos, sendo o primeiro caracterizado pela decomposição de ácidos graxos poli-insaturados, seguidos pelos monoinsaturados e por fim os saturados.

Sendo assim, diante dos resultados obtidos, para a próxima etapa foram incorporadas no gel hidrofílico micro e nanopartículas contendo 50% de OCV, 2% α -tocoferol e 48% de cera de abelha.

5.5. Reprodutibilidade do processo

Para garantir que o processo de produção das micro e nanopartículas foram reprodutíveis estas foram produzidas em triplicata e depois foram verificados os desvios padrões dos seus tamanhos e seus teores de OCV.

As amostras foram produzidas com 50% de OCV, 2% de α -tocoferol e 48% de cera de abelha nas seguintes condições, conforme Tabela 20.

Tabela 20. Condições do processo para a produção das micro e nanopartículas.

Micropartículas	Nanopartículas
<ul style="list-style-type: none"> • Vazão do ar de resfriamento: 1,5m³/min • Vazão de dispersão: 4,5mL/min • Temperatura: 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Ultra-turrax • Velocidade: 16.000rpm • Tempo: 5 minutos • Tween 80: 2g • Poloxamer: 4g • Temperatura: 70°C

Após a produção das micro e nanopartículas foram feitos estudos para verificar o tamanho das partículas bem como o teor de OCV usando o ácido palmítico como marcador químico. Os resultados obtidos estão na Tabela 21.

Tabela 21. Tamanho das partículas e teor de OCV nos estudos de reprodutibilidade do processo.

	MICROPARTÍCULAS		NANOPARTÍCULAS	
	Tam (µm)	Teor (%)	Tam (nm)	Teor (%)
Amostra 1	73,17	95,7	291,2	87,8
Amostra 2	77,03	93,3	257,8	88,3
Amostra 3	76,9	92,8	307,9	85,4
Desvio	1,79	1,27	20,83	1,27
Média	75,7	93,93	285,63	87,17
CV	0,024	0,01	0,073	0,01
CV%	2,4	1,3	7,29	1,5

Como pode ser observado, de acordo com os parâmetros estudados, a produção de micro e nanopartículas, nas condições do presente estudo, foram reprodutíveis apresentando um coeficiente de variação aceitável.

5.6. Preparação das formulações: L-OCV, M-OCV e N-OCV.

Uma vez definido o processo e a concentração de OCV presente nas partículas, iniciou-se a avaliação do gel hidrofílico que será usado como veículo desses sistemas nos estudos de FPS *in vitro*, letalidade em *Artemia salina*, liberação *in vitro*, permeação e retenção cutânea *in vitro*, estabilidade e estudo clínico. A avaliação do gel hidrofílico para ser usado como veículo para o OCV em sua forma líquida e também para os sistemas micro e nanoparticulados levou em consideração as propriedades organolépticas de

cada gel (Natrosol[®], Carbopol[®], CMC, Aristoflex[®]), bem como a estabilidade por centrifugação e o tamanho de partículas.

Para as propriedades organolépticas, o gel de Natrosol[®], o gel de Carbopol[®] e o gel de Aristoflex[®] apresentaram melhores características do que o gel de CMC. Este último apresentou pegajosidade e dificuldades no espalhamento.

No teste preliminar de estabilidade por centrifugação, o gel de Natrosol[®] foi o único que apresentou separação de fases. Isso ocorreu para as três formulações testadas neste gel (M-OCV, N-OCV e L-OCV).

Para os testes de tamanho de partículas todas as formulações contendo micropartículas apresentaram redução em seu tamanho, podendo ter ocorrido uma melhor dispersão das mesmas em gel, desfazendo possíveis aglomerados. Já no caso das nanopartículas, ocorreu um pequeno aumento em seu diâmetro médio, devido à liofilização. Os resultados para o tamanho das partículas após incorporação no gel hidrofílico estão apresentados na Tabela 22. Vale lembrar que os valores médios para o tamanho das micro e nanopartículas antes da incorporação no gel foram em média de 75,5µm e 285,6nm, respectivamente.

Tabela 22. Tamanho das micro e nanopartículas após incorporação no gel

Gel	Micropartícula (µm)	Nanopartículas (nm)
Natrosol [®]	42,50	359,0
Carbopol [®]	37,16	370,0
CMC	65,93	357,8
Aristoflex [®]	37,90	361,0

Diante dos resultados, o gel de aristoflex[®] será utilizado como veículo para a produção dos géis M-OCV, N-OCV e L-OCV, para os estudos de comparação entre estas formulações.

5.7. Comparação entre os hidrogéis contendo L-OCV, M-OCV e N-OCV

5.7.1. Estudo da Estabilidade Física

Os três géis foram avaliados quanto alterações de cor, separação de fases e homogeneidade por um período de 90 dias, controlando a umidade (75 ± 2 UR) e as temperaturas em 25 ± 2 °C e 40 ± 2 °C. Na Figura 32 estão as fotografias tiradas em cada tempo.

Figura 32. Fotografias das amostras dos géis L-OCV, M-OCV e N-OCV, separadamente, nos respectivos tempos pré determinados para o estudo de estabilidade física.

Segundo a Figura 32, observa-se uma visível alteração de cor conforme o avanço do tempo, principalmente na temperatura de 40°C, para todas as amostras. Porém não houve separação de fases e todas as amostras continuaram homogêneas. Apenas o gel contendo nanopartículas armazenado à 40°C, à partir do tempo de 60 dias, apresentou alteração em sua viscosidade por avaliação visual, tornando-se mais fluido.

O estudo do comportamento reológico é muito importante para a caracterização físico-química de formulações cosméticas. Esta caracterização é utilizada para determinar os efeitos do tempo e a estabilidade de sistemas semi-sólidos (DI MAMBRO & FONSECA, 2005). Dentre as variáveis reológicas estudadas, a viscosidade aparente é considerada a medida da resistência do material em um ponto sob cisalhamento constante, sendo que maiores viscosidades geram maiores resistências (SOUZA & FERREIRA, 2010; MARTIN, BUSTAMANTE, CHU, 1993).

Na avaliação da viscosidade aparente dos diferentes géis (Figura 33), observou-se que todas apresentaram variações nesse parâmetro físico. Muitos fatores podem alterar a viscosidade de uma formulação, tais como, composição de lipídios, proporção entre fase aquosa e oleosa, concentração de doadores de viscosidade e também pela presença de polímeros. No entanto, apesar das alterações na viscosidade, não houve separação de fases em nenhum gel estudado. Em contraponto, os géis contendo nanopartículas foram os que apresentaram melhor estabilidade visual, levando-se em consideração a coloração das amostras (Figura 32).

Figura 33. Viscosidade aparente dos três géis, nos tempos e temperaturas determinados para os estudos de estabilidade.

Como pode ser observado, a maior variação da viscosidade aparente foi encontrada nos géis contendo nanopartículas (Figura 34), o que talvez possa ser explicado devido o uso de polissorbatos na fase de preparo dessas estruturas. No entanto, essas alterações na viscosidade não foram suficientes para separar fases, além disso, segundo tratamento estatístico (teste t-Student pareado), comparando as viscosidades iniciais e finais, só houve diferença significativa para o gel de M-OCV ao se comparar os valores obtidos no tempo zero e após 90 dias em temperatura de 45°C ($p=0,0256$), segundo Tabela 23.

Tabela 23. Tratamento estatístico realizado para M-OCV nos ensaios de viscosidade.

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
T	6,1261117
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,025626074
Média das Diferenças	559
Desvio Padrão das diferenças	158,0474612
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	166,3883413
Limite Superior	951,6116587

Figura 34. Comparação da variação das viscosidades nos respectivos tempos e temperaturas.

Como o objetivo do presente trabalho foi verificar e avaliar as vantagens e desvantagens da utilização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas, apenas incorporamos as partículas em um gel hidrofílico para veicular essas estruturas com o intuito de ter o mínimo de interferência possível. Sendo assim, essas alterações na viscosidade poderiam ser corrigidas fazendo um estudo aprofundado de diferentes formulações cosméticas contendo, por exemplo, componentes doadores de viscosidade.

5.7.2. Estudo da Estabilidade Química

O estudo da estabilidade química das amostras foi realizado por cromatografia gasosa, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa dos componentes e também por ser um método analítico amplamente utilizado para a detecção de ácidos graxos.

A estabilidade química dos géis foi associada à degradação do AcP presente em grande quantidade no OCV. Os óleos vegetais são constituídos principalmente por ácidos graxos e esses são passíveis de degradação sendo, portanto, substâncias importantes para o estudo químico de estabilidade.

Na tabela 24 estão os valores em percentagem para a perda de ácido palmítico ao longo do tempo determinado para o estudo de estabilidade, em suas respectivas temperaturas.

Tabela 24. Valores em percentagem da perda de ácido palmítico ao longo do estudo de estabilidade.

	7dias	15dias	21dias	28dias	60dias	90dias
OCV 25°C	5,1	9,8	33,7	33,8	38,6	43,3
OCV 40°C	5,2	5,2	18,1	40,4	51,8	62,0
Micro 25°C	0,7	2,8	4,5	21,3	23,7	30,6
Micro 40°C	1,5	13,3	23,9	32,8	40,7	46,2
Nano 25°C	3,5	7,7	9,4	9,7	18,5	26,7
Nano 40°C	4,8	7,6	10,1	19,1	27,8	30,6

A Figura 35 representa a perda de massa em percentagem do ácido palmítico dos três géis estudados durante todo o tempo de estudo nas temperaturas de 25 e 40°C.

A maior degradação aconteceu à 40°C na amostra L-OCV, com uma perda final de 62% da quantidade de AcP presente na formulação. Nestas mesmas condições, o gel N-OCV apontou a menor perda (30,6%), ou seja, a produção de nanopartículas no presente estudo apresentou, nessas condições, uma diminuição de 49% na degradação do ácido palmítico o que mostra uma considerável proteção.

Figura 35. Representação da perda de massa em porcentagem dos três géis estudados, nos respectivos tempos e temperaturas.

Como pode ser observado na Figura 35, o OCV quando é micro ou nanoestruturado oferece maior proteção aos ácidos graxos.

O encapsulamento dos AGs pode ser uma alternativa para aumentar a estabilidade dessas substâncias, retardando o processo de oxidação dos mesmos e também protegendo contra a peroxidação lipídica (TEHRANY *et al.*, 2011; MARCATO, 2009; CAO-HOANG, FOUGERÈ, WACHÉ, 2011; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999).

Esse aumento da estabilidade física para os sistemas micro e nanoestruturados são de fundamental importância para vários setores, principalmente para as indústrias cosmética e alimentícia, onde óleos vegetais são amplamente utilizados. O controle da degradação em lipídios é considerado por Esquivel, Ribeiro e Bernardo-Gil (2009) um dos grandes desafios para as indústrias cosmética e alimentícia.

5.7.3. Letalidade em *Artemia salina*

O estudo de letalidade em *Artemia salina* permite avaliar a toxicidade sobre este microcrustáceo, sendo um ensaio preliminar para a avaliação de citotoxicidade. Considera-se que os náuplios de *Artemia salina* Leach apresentam sensibilidade para substâncias tóxicas, já que este microcrustáceo

se alimenta de bactérias, algas, protozoários e detritos suspensos no meio. Uma alta concentração de resíduos causa acúmulo nos toracópodos causando ação tóxica neste crustáceo. Através desses ensaios, muitas moléculas com atividades citotóxicas e com potencial antitumoral têm sido descobertas (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008; SANTOS PIMENTA *et al.*, 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2000).

Conforme Figura 36, as formulações em gel contendo OCV, α -tocoferol, cera de abelha em concentrações de até 100 μ g/mL apresentaram pouca atividade contra este microcrustáceo. Em altas concentrações, acima de 1000 μ g/mL foi observado a letalidade de mais de 50% dos náuplios. Em baixas e altas concentrações, as três formulações não apresentaram diferenças significativas em termos de letalidade. Porém, na concentração de 500 μ g/mL as formulações contendo nanopartículas apresentaram letalidade maior que 50%, diferentemente das formulações contendo micropartículas ou OCV líquido, onde a letalidade nesses dois últimos casos se manteve em torno de 20%. Neste caso as formulações foram estatisticamente diferentes, esse fato talvez possa ser explicado devido o tamanho reduzido das nanopartículas, o que pode torna-las mais permeáveis (DAUDT *et al.*, 2013).

Figura 36. Letalidade em *Artemia salina*. *valor estatisticamente diferente em 500 μ g/mL.

A Tabela 25 apresenta o tratamento estatístico para a viabilidade celular dos três géis na concentração de 500µg/mL, onde houve diferença significativa para a Letalidade em *Artemia salina* para N-OCV.

Tabela 25. Tratamento estatístico para Letalidade em *Artemia Salina* para os géis M-OCV, N-OCV e L-OCV.

RESUMO				
Grupo (500µg/mL)	Contagem	Soma	Média	Variância
Micro	3	60	20	0
Nano	3	170	56,66667	233,3333
OCV	3	70	23,33333	33,33333

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2466,667	2	1233,333	13,875	0,005619	5,143253
Dentro dos grupos	533,3333	6	88,88889			
Total	3000	8				

Segundo Wang *et al.* (2007) o tamanho reduzido e o aumento da superfície de contato fazem das nanopartículas um grupo capaz de promover uma toxicidade mais pronunciada do que as micropartículas. No estudo feito por Wang *et al.* (2007) foi avaliado a toxicidade de micro e nanopartículas contendo zinco, os autores observaram que os ratos tratados com a suspensão de nanopartículas apresentaram nos primeiros dias sintomas de letargia, náusea, vômito e diarreia, já aqueles tratados com as micropartículas não apresentaram tais sintomas.

Outro ponto bastante discutido na produção de nanopartículas é a questão ambiental e a saúde humana, onde essas partículas de tamanho reduzido podem vir apresentar riscos (QUINA, 2004). Sendo assim, este estudo de letalidade em *Artemia salina* é importante também para determinar que o uso e a produção das nanopartículas não oferecem riscos ao meio ambiente, dentro das condições estudadas.

5.7.4. Viabilidade celular

Todos os componentes utilizados para a formulação dos géis estudados já são comercializados em produtos cosméticos sendo, portanto, considerados

seguros para a utilização. Porém, estudos mostram que alterações no tamanho podem favorecer o surgimento ou aumento da toxicidade das substâncias (WANG *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no ensaio XTT foram plotados em termos de viabilidade celular (porcentagem de células vivas) em função de diferentes concentrações de amostra, conforme Tabela 26.

Tabela 26. Porcentagem de células vivas após ensaio XTT.

	Micro	Nano	OCV
125	91,56	98,30	100,90
250	94,70	100,20	99,48
500	92,16	91,80	94,41
1000	96,87	92,36	86,80
2000	103,24	75,81	99,57

Conforme representado na Figura 37, todas as amostras exibiram baixa toxicidade em células de fibroblasto murino (L929), não havendo diferenças significativas entre as amostras segundo tratamento estatístico.

Pode-se observar (Figura 37) uma grande tolerância celular na presença dos três géis estudados e em diferentes concentrações, sugerindo que todas as amostras poderiam ser usadas com segurança em formulações tópicas.

Figura 37. Representação da viabilidade celular em diferentes concentrações dos três géis estudados.

Segundo tratamento estatístico ANOVA não houve diferenças significativas na comparação entre os três grupos, porém uma análise feita

dentro de cada grupo mostrou que os géis L-OCV e M-OCV apresentaram diferenças significativas na porcentagem de células vivas nas concentrações estudadas (Tabela 27 e 28).

Tabela 27. Tratamento estatístico realizado para os testes de viabilidade celular (gel M-OCV).

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Micropartícula 2000 mg/ml	3	309,7084	103,2361	28,64623
Micropartícula 1000 mg/ml	3	290,5986	96,86621	0,239034
Micropartícula 500 mg/ml	3	276,4774	92,15912	0,819193
Micropartícula 250 mg/ml	3	285,5718	95,19059	1,863186
Micropartícula 125 mg/ml	3	281,4275	93,80916	21,42516

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	219,0028	4	54,75071	5,165862	0,01611819	3,47805
Dentro dos grupos	105,9856	10	10,59856			
Total	324,9885	14				

Tabela 28. Tratamento estatístico realizado para os testes de viabilidade celular (gel L-OCV).

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
OCV 2000 mg/ml	4	398,2604	99,56511	8,945189
OCV 1000 mg/ml	4	347,1988	86,79969	1,461688
OCV 500 mg/ml	4	377,6413	94,41034	9,449761
OCV 250 mg/ml	4	389,7672	97,4418	9,013905
OCV 125 mg/ml	4	414,4794	103,6199	16,30762

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	637,3953	4	159,3488	17,6356	1,5337E-05	3,055568
Dentro dos grupos	135,5345	15	9,035632			
Total	772,9298	19				

Um estudo feito anteriormente por Wagemaker *et al.* (2015) verificou a citotoxicidade por MTT de formulações contendo 2,5, 5, 10 e 15% de OCV, bem como do OCV puro. Os resultados obtidos também demonstraram a ausência de citotoxicidade em todas as amostras estudadas.

5.7.5. Teste FPS *in vitro*

Os géis desenvolvidos foram avaliados, entre si, quanto ao seu potencial fotoprotetor.

A Figura 38, mostra as curvas de absorbância obtidas para os três géis. Neste, pode ser observado que as absorbâncias obtidas para os géis contendo as micropartículas e OCV líquido apresentam valores próximos entre si. Apesar de estes apresentarem um aumento sob a área da curva, quando comparados com o gel de nanopartículas, segundo tratamento estatístico essa diferença não foi significativa.

Figura 38. Curvas de absorbâncias dos géis contendo micropartículas, nanopartículas ou OCV em sua forma líquida.

Os fatores de proteção solar calculados pelo método de Mansur *et al.* (1986) estão representados no Figura 39.

Figura 39. Gráfico com os valores obtidos para FPS nos três géis. Houve diferenças significativas entre Micro e Nano (0,0003) e entre OCV e Nano (0,0001)

Segundo tratamento estatístico houve diferença significativa no FPS do gel N-OCV quando comparado com os géis M-OCV e L-OCV, conforme Tabela 29.

Tabela 29. Tratamento estatístico para os FPSs encontrados pelo método espectrofotométrico.

Informação	Valor (MicroxNano)
T	50,59418457
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,000390431
Média das Diferenças	0,088133333
Desvio Padrão das diferenças	0,003017173
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	0,08063826
Limite Superior	0,095628407

Informação	Valor (NanoxOCV)
T	-81,7638403
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,000149548
Média das Diferenças	-0,0819
Desvio Padrão das diferenças	0,001734935
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	-0,086209818
Limite Superior	-0,077590182

O fator de proteção solar para o OCV no presente estudo foi entre 0,19 e 0,28, estando de acordo com os resultados obtidos no estudo realizado por Wagemaker (2013), onde foram encontrados valores próximos a 0,22 em concentrações de 5% de óleo de café. Segundo Alvarez; Rodrigues (2000), o

óleo de café apresenta a capacidade de bloquear a radiação solar entre 280 e 320nm (faixa em que ocorre o eritema), porém permite sua passagem na faixa onde ocorre o bronzeado (entre 320 e 400nm). Vários autores como Pereda *et al.* (2009) e Savian *et al.* (2011), realizaram estudos avaliando o fator de proteção solar do OCV, ambos apresentaram resultados positivos para o bloqueio da radiação solar com o uso deste óleo. Porém Savian *et al.* (2011) também encontrou valores baixos para o fator de proteção solar do OCV (cerca de 2,5), mas o autor conclui que o mesmo pode ser usado para potencializar a ação fotoprotetora dos filtros químicos utilizados atualmente.

Segundo Wagemaker (2009) os filtros solares considerados com baixo FPS podem ter sua potência recompensada utilizando uma maior concentração. Neste estudo observou que aumentando a concentração do óleo de café obtém-se um fator de proteção mais elevado, concluindo que para obter um FPS igual a 15 deveria ser utilizada uma concentração de 2µl/ml.

5.7.6. Teste FPS *in vitro* Labsphere

Outra forma de se avaliar a eficácia *in vitro* de formulações fotoprotetoras é a espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere®), através de parâmetros como o fator de proteção solar estimado (FPS) e o comprimento de onda crítico (λ_c) (NISHIKAWA, *et al.*, 2013).

O comprimento de onda crítico fornece informações sobre o perfil de absorção das formulações. Para serem consideradas eficazes frente à exposição à radiação UVA, as amostras devem apresentar valores de comprimento de onda crítico superiores à 370nm (NISHIKAWA, 2013).

Conforme a Figura 40, as amostras contendo nanopartículas e OCV apresentaram valores de comprimento de onda crítico superiores à 370nm, sugerindo um bom perfil de absorção nos espectro de radiação UVA. Sendo que, a formulação L-OCV apresentou um comprimento de onda maior que 370nm mesmo depois da irradiação.

Figura 40. Comprimento de onda crítico apresentado para os três géis antes e depois de sofrerem irradiação. Houve diferenças significativas entre nano pré e pós irradiação ($p=0,0489$); OCV pré e pós irradiação ($p=0,0489$); micro e nano pós irradiação ($0,0240$) e nano e OCV pós irradiado ($p=0,0367$).

As amostras N-OCV e L-OCV apresentaram diferenças significativas para o comprimento de onda crítico, conforme dados das Tabelas 30 e 31.

Tabela 30. Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos de comprimento de onda no Labsphere®, para as amostras pré e pós irradiadas.

Informação	Valor (OCV pré e pós irradiado)
T	4,358898944
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,048810269
Média das Diferenças	6,333333333
Desvio Padrão das diferenças	2,516611478
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	0,081723854
Limite Superior	12,58494281

Informação	Valor (Nano pré e pós irradiado)
T	4,34982407
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,048999403
Média das Diferenças	44,66666667
Desvio Padrão das diferenças	17,7857621
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	0,484384312
Limite Superior	88,84894902

Tabela 31. Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos de comprimento de onda no Labsphere®, para as amostras pós irradiadas.

Informação	Valor (micro e nano pós irradiado)	Informação	Valor (nano e ocv pós irradiado)
T	6,328318817	T	-5,070577464
Graus de Liberdade	2	Graus de Liberdade	2
P-valor	0,024072297	P-valor	0,036762823
Média das Diferenças	29	Média das Diferenças	-44,33333333
Desvio Padrão das diferenças	7,937253933	Desvio Padrão das diferenças	15,14375559
Hipótese Alternativa: Diferente de	0	Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%	Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	9,282768177	Limite Inferior	-81,95250769
Limite Superior	48,71723182	Limite Superior	-6,714158978

Nos gráficos de absorbância em função do comprimento de onda (Figuras 41, 42 e 43), todas as amostras apresentaram valores baixos ao longo do espectro ultravioleta (290 a 400nm), ou seja não houve uma absorção/reflexão significativa da radiação, apresentando um fator de proteção solar baixo. Porém, o OCV pode ser utilizado como coadjuvante em formulações fotoprotetoras ou ainda serem utilizados uma maior concentração de OCV para obter um FPS mais elevado (Savian *et al.*, 2011; Wagemaker, 2009).

Figura 41. Espectro de absorbância M-OCV

Figura 42. Espectro de absorbância N-OCV

Figura 43. Espectro de absorbância L-OCV

Na Figura 44 estão os fatores de proteção solar estimados pelo Labsphere®, antes e depois da irradiação para os três géis estudados.

Figura 44. FPS estimado para os três géis estudados.

Conforme representado na Figura 44, apesar de não haver diferença significativa, observa-se um maior fator de proteção solar para os géis preparados com OCV líquido. Segundo Seixas (2014) o tamanho das partículas podem interferir no poder de reflexão, dispersão ou absorção da radiação UV, sendo assim essa poderia ser uma explicação para a diferença encontrada no presente estudo com relação ao FPS das nanopartículas. Porém, para afirmar tal premissa, estudos mais detalhados devem ser realizados.

Segundo Chiari *et al.* (2014), por questões práticas e éticas, a determinação do FPS para substâncias novas pode ser feita através de testes *in vitro*. Usando testes confiáveis que podem ser correlacionados com resultados *in vivo*. O método espectrofotométrico na região UV é considerado eficiente e confiável. Neste estudo, foi observado um baixo FPS em formulações contendo 10% de OCV bem como para o óleo puro. Porém, diferenças expressivas foram observadas quando este óleo foi adicionado à formulações contendo filtros solares sintéticos, o que talvez possa ser explicado por um efeito sinérgico entre o óleo e a substância fotoprotetora utilizada.

Um outro estudo realizado por Wagemaker *et al.* (2015) avaliou o FPS do OCV em testes *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* realizados por espectrômetro de refletância com esfrea integrada foram observados valores baixos de proteção solar nas formulações estudadas, porém este foi aumentando proporcionalmente com aumento da concentração de OCV presente nas formulações, atingindo o máximo de 2,3 em amostras com 15% de OCV. Por suas propriedades antiinflamatórias, Wagemaker *et al.* (2015) também avaliou em seu estudo a ação protetora *in vivo* do OCV usando pele de animal irradiado. Nestes ensaios, foi observado que nem as maiores concentrações de OCV foram capazes de prevenir o eritema causado pela irradiação, no entanto os resultados sugerem que a ação deste óleo está ligada à proteção pós radiação, uma vez que mostraram um menor número de células queimadas pelo sol.

Dessa forma, pode-se concluir que a adição do OCV em formulações fotoprotetoras apresentam influências positivas tanto para o FPS quanto para os efeitos protetores da pele.

5.7.7. Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro*

Este estudo foi realizado para avaliar a diferença na permeação/retenção entre as diferentes estruturas propostas por este trabalho. Para isso foram utilizadas células de difusão de Franz, utilizando pele de orelha de porco.

Os resultados para esse estudo demonstraram que as micropartículas apresentaram maior afinidade pelo estrato córneo, uma vez que foram quantificados maiores níveis de ácido palmítico no *tape stripping* da formulação contendo essas microestruturas (Figura 45).

Figura 45. Resultados obtidos pela quantificação do ácido palmítico presente nas amostras de estrato córneo retirados por *tape stripping*. Houve diferença significativa entre micro e nano ($p=0,0122$); micro e OCV ($p=0,0087$) e nano e OCV ($p=0,0273$).

Os géis M-OCV e N-OCV apresentaram diferenças significativas para a quantidade de OCV presente no estrato córneo, quando comparados com o L-OCV (Tabela 32).

Tabela 32. Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos na determinação da quantidade de OCV presente nas amostras de estrato córneo retiradas por *tape stripping*.

Informação	Valor (MicroxNano)	Informação	Valor (MicroxOCV)
T	8,959079482	T	10,60426149
Graus de Liberdade	2	Graus de Liberdade	2
P-valor	0,012230616	P-valor	0,008775921
Média das Diferenças	0,000700112	Média das Diferenças	0,000782626
Desvio Padrão das diferenças	0,000135352	Desvio Padrão das diferenças	0,000127831
Hipótese Alternativa:		Hipótese Alternativa:	
Diferente de	0	Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%	Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	0,000363879	Limite Inferior	0,000465078
Limite Superior	0,001036345	Limite Superior	0,001100175

Informação	Valor (NanoxOCV)
T	5,919999497
Graus de Liberdade	2
P-valor	0,027367675
Média das Diferenças	8,25144E-05
Desvio Padrão das diferenças	2,41418E-05
Hipótese Alternativa: Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	2,2543E-05
Limite Superior	0,000142486

A quantificação para derme e epiderme demonstrou maiores níveis de ácido palmítico nas amostras contendo nanopartículas, o que sugere uma maior permeação dessa nanoestrutura (Figura 46).

Figura 46. Resultados obtidos pela quantificação do ácido palmítico presente nas amostras de derme e epiderme trituras. Houve diferença significativa entre micro e nano ($p=0,0076$) e nano e OCV ($0,0106$).

Na Tabela 33 estão os tratamentos estatísticos que indicam as diferenças significativas para nanopartículas quantificadas nas amostras de derme e epiderme trituradas.

Tabela 33. Resultado da aplicação do Teste T pareado para os valores obtidos na determinação da quantidade de OCV presente nas amostras de derme e epiderme triturados.

<i>Informação</i>	<i>Valor (MicroxNano)</i>	<i>Informação</i>	<i>Valor (NanoxOCV)</i>
T	-11,35620301	T	9,597737833
Graus de Liberdade	2	Graus de Liberdade	2
P-valor	0,007665101	P-valor	0,010682176
Média das Diferenças	-0,000718921	Média das Diferenças	0,00085028
Desvio Padrão das diferenças	0,00010965	Desvio Padrão das diferenças	0,000153445
Hipótese Alternativa:		Hipótese Alternativa:	
Diferente de	0	Diferente de	0
Intervalo de Confiança	95%	Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	-0,000991307	Limite Inferior	0,0004691
Limite Superior	-0,000446535	Limite Superior	0,001231459

Não foi possível quantificar o ácido palmítico nas soluções receptoras em nenhum tempo estudado, sugerindo que talvez nenhuma das três formulações estudadas são capazes de permear através da pele além da epiderme e derme. Porém, os maiores níveis de ácido palmítico presente na derme e epiderme das amostras contendo nanopartículas demonstram que estas estruturas talvez possam ser capazes de ultrapassar a barreira formada pelo estrato córneo.

Estudos com nanoemulsões têm sido realizados com óleos que exibem atividade terapêutica. Essas formulações contendo nanoestruturas são consideradas promissoras uma vez demonstram penetrar significativamente mais rápido do que àquelas contendo macroestruturas, além de conferir uma maior hidratação à pele (ALMEIDA *et al.*, 2009; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET & ALLORET, 2004).

5.7.8. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

O princípio desta medida é baseado na capacitância de um meio dielétrico, onde qualquer alteração na constante dielétrica em função da

hidratação da pele altera a capacitância do dispositivo. Os resultados são fornecidos pelo próprio equipamento em função do conteúdo aquoso do estrato córneo, dados em unidades arbitrárias (UA) (MERCURIO, 2012).

Um filme hidrolipídico presente no estrato córneo mantém a quantidade de água desta camada, formando uma barreira protetora que evita a penetração de substâncias danosas ao organismo, além de proteger a pele do ressecamento e manter sua flexibilidade (DAL-BELO *et al.*, 2006). O Corneometer®, método que avalia através da capacitância o conteúdo aquoso do estrato córneo foi utilizado para este estudo.

Na Figura 47 estão representados os valores obtidos neste equipamento para o conteúdo aquoso do estrato córneo, onde foram calculadas as médias das medições para cada voluntária e posteriormente calculada a média geral de todas elas.

Figura 47. Conteúdo aquoso do estrato córneo de voluntárias (n=10) obtido para os três géis. Medidas feitas no ato da aplicação e depois de duas horas. Houve diferença significativa apenas entre micro antes e depois de 2h ($p=0,041$).

A análise estatística foi realizada levando em consideração apenas o antes e o depois de cada formulação. As diferenças entre as formulações não foram avaliadas devido à variação natural do conteúdo aquoso basal de cada região estudada. Segundo tratamento estatístico (Tabela 34) apenas as formulações contendo as micropartículas foram capazes de melhorar significativamente o conteúdo aquoso do estrato córneo após duas horas de

aplicação. O aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo proporciona um efeito hidratante por mecanismo umectante (GIANETI e MAIA CAMPOS, 2012).

Tabela 34. Resultado da aplicação do Teste de Wilcoxon Pareado para os valores obtidos na determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo com as formulações contendo micropartículas.

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
V	7
P-valor	0,04135891
Hipótese Nula	0
Método	Teste Wilcoxon
(Pseudo) Mediana	-2,399919356
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	-4,799929277
Limite Superior	-0,300048827

5.7.9. Determinação da perda transepidérmica de água

Outro parâmetro importante é avaliar a perda de água transepidérmica. O equipamento Tewameter® mede esta perda de água, que representa a evaporação de água pela pele, sendo utilizado para avaliar a integridade da barreira da pele humana para a perda de água insensível.

Conforme representado na Figura 48, quanto menor for o valor obtido menor a perda de água da pele e melhor a função barreira desta (LEONARDI *et al.*, 2002)

Figura 48. Perda de água transepidermica de voluntárias (n=10) obtido para os três géis. Medidas feitas no ato da aplicação e depois de duas horas. Houve apenas diferença significativa entre nano ante e depois de 2h (p=0,049).

Segundo tratamento estatístico (Tabela 35) apenas os géis contendo as nanopartículas apresentaram melhoras significativas nos níveis de perda de água após duas horas de aplicação.

Tabela 35. Resultado da aplicação do Teste de Wilcoxon Pareado para os valores obtidos na determinação da perda transepidermica de água com as formulações contendo nanopartículas.

<i>Informação</i>	<i>Valor</i>
V	47
P-valor	0,048828125
Hipótese Nula	0
Método	Teste Wilcoxon
(Pseudo) Mediana	1,15
Intervalo de Confiança	95%
Limite Inferior	0,2
Limite Superior	1,8

Conforme Gianeti e Maia Campos (2012) as medidas de TEWL têm sido utilizadas para monitorar a integridade do estrato córneo (função barreira). Para melhorar a umectação cutânea e manter as condições normais da pele é importante a manutenção do estrato córneo e uma diminuição da perda transepidermica de água.

Nessas condições, apenas os sistemas contendo micro e nanopartículas apresentaram melhoras significativas nos testes clínicos realizados, sugerindo que o mesmo componente pode apresentar diferentes ações apenas alterando o seu tamanho. Dessa forma, produtos inovadores podem ser formulados utilizando não apenas essas estruturas separadamente, mas também uma combinação entre micro e nanopartículas, dando origem à uma formulação que poderia vir a melhorar ainda mais a hidratação e a manutenção da integridade da pele. Estas estruturas podem vir atuar sinergicamente, protegendo a função barreira e aumentando a hidratação da pele, podendo assim prevenir os sinais precoces do envelhecimento cutâneo.

Um estudo foi realizado anteriormente por Wagemaker *et al.* (2015) para avaliar a perda de água transepidermica e a hidratação na pele de voluntárias em um período de 48 horas. Os resultados demonstram que formulações contendo 15% de OCV melhoram a função barreira da pele, evitando a perda

de água transepidérmica, porém o conteúdo aquoso do estrato córneo não foi alterado para nenhuma formulação estudada.

Nesse contexto, o uso de MLSs e NLSs pode melhorar os efeitos de cuidados com a pele do OCV além de possibilitar o uso de menores concentrações de óleo. Vale lembrar que no presente estudo, os hidrogéis foram preparados com 10% de partículas o que equivale a cerca de 5% de OCV, os quais desempenharam ações significativas tanto para a perda de água transepidermica quanto para a hidratação da pele.

Elevados conteúdos de óleos vegetais em formulações cosméticas podem levar a efeitos sensoriais indesejáveis tais como oleosidade e pegajosidade (WAGEMAKER, *et al.*, 2013). Sendo assim, o uso das MLSs e NLSs contendo OCV poderia proporcionar uma diminuição do conteúdo lipídico, representando vantagens sensoriais e econômicas, uma vez que diminuiria a concentração de óleo utilizada.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A técnica de *spray congealing* e a microemulsão à quente se mostraram eficientes para a produção de micro e nanopartículas de OCV, uma vez que possibilitaram, em condições otimizadas, bons rendimentos e teores de OCV, bem como tamanho de partículas adequados para o presente estudo.

Todas as amostras estudadas apresentaram um baixo teor de umidade, o que garante uma melhor estabilidade do material.

Um estudo mais detalhado da composição das partículas mostrou que as proporções entre seus componentes possivelmente não interferem na estabilidade oxidativa desses sistemas.

As análises de tamanho de partícula e teor de OCV mostraram que nessas condições, as técnicas de preparo das micro e nanopartículas podem ser consideradas reproduzíveis.

A incorporação em gel de Aristoflex® dos sistemas particulados e do OCV líquido indica ser estável no teste de centrifugação, considerado um estudo preliminar de estabilidade.

O estudo comparando os géis M-OCV, N-OCV e L-OCV mostrou diferença estatística para a letalidade em *Artemia salina* em concentrações de 500µg/mL. O gel contendo nanopartículas nessa concentração apresentou uma taxa de letalidade maior que 50%, diferentemente das formulações contendo micropartículas ou OCV líquido, onde a letalidade nesses dois últimos casos se manteve em torno de 20%.

Nos estudos de viabilidade celular todas as amostras apresentaram resultados positivos, sugerindo que as mesmas poderiam ser utilizadas sem causar toxicidade à pele em formulações tópicas.

Os estudos de FPS mostraram uma baixa proteção solar nas concentrações estudadas, porém o OCV apresenta valores de comprimento de onda crítico maior que 370nm, sugerindo um perfil de absorção no espectro de radiação UVA.

Nos estudos de estabilidade todos os géis apresentaram variação na viscosidade, porém isso pode ser facilmente corrigido com um estudo mais detalhado de formulação, onde podem ser adicionados, por exemplo, componentes doadores de consistência.

Na estabilidade química, os sistemas micro e nanoparticulados apresentaram melhoras significativas na proteção do ácido palmítico contra a degradação, sendo um fator de extrema importância para o desenvolvimento de formulações contendo lipídios.

Os estudos de permeação e retenção cutânea demonstram uma melhor capacidade das nanopartículas em transpor a barreira formada pelo estrato córneo, que é considerada um dos maiores obstáculos fornecidos pela pele à penetração de substâncias.

Nos ensaios clínicos, as micropartículas apresentaram melhoras para o conteúdo aquoso do estrato córneo e as nanopartículas apresentaram resultados melhores para os testes realizados para avaliar a perda transepidermica de água. O OCV líquido não apresentou diferenças significativas para os parâmetros avaliados após 2 horas da aplicação. Portanto, produtos mais eficientes poderiam ser elaborados apenas utilizando a combinação dos sistemas micro e nanoestruturados contendo OCV.

O presente estudo demonstrou a importância de se avaliar e desenvolver novas técnicas para o aprimoramento e elaboração de produtos inovadores, com propriedades aperfeiçoadas e/ou ampliadas.

Em vista disso, as formulações contendo sistemas micro e nanoparticulados apresentaram de uma forma geral, um melhor desempenho quando comparadas ao OCV líquido. Formulações contendo micro e nanoestruturas podem ser desenvolvidas com o intuito de melhorar ainda mais o desempenho das propriedades do OCV, atuando sinergicamente.

*Referências
Bibliográficas*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, 2011, disponível em <<https://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/PANORAMA-DO-SETOR-2014PORTUGU%C3%8AS-07-ABR.pdf>>, acesso em 29/08/2015.

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetic. **Phytoterapy Research**, v. 17, p. 987-1000, 2003.

AHSHAWAT, M. S.; SARAF, S.; SARAF, S. Preparation and characterization of herbal creams for improvement of skin viscoelastic properties. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 183-193, 2008.

ALBERTINI, B.; PASSERINI N.; PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALMEIDA, J. S., JEZUR L., FONTANA, M. C., PAESE, K., SILVA, C. B., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S., BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): Preparation and characterization. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, p. 165-172, 2009

ALVAREZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y Aceites**, v. 51, 2000.

ARAUJO, F. D. S.; MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H. Biodiesel metílico de *Dipteryx lacunifera*: Preparação, caracterização e efeitos de antioxidantes na estabilidade à oxidação. **Química Nova**, v. 33, p. 1671-1676, 2010.

AUTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Ed. Artmed: Porto Alegre, 2005.

AVELAR, A. C.; SOUZA, C. G. Inovação e desenvolvimento de produtos na Indústria de Cosméticos: um estudo de caso. **Revista Gestão Industrial**, v. 2, n. 2, p. 87-97, 2006.

AZEVEDO, A. B. A.; KIECHBUSH, T. G.; TASHIMA, A. K.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P. S. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **J. Supercritic Fluids**, v. 44, p. 186-192, 2008.

BAHIA, M. F. **Proteção solar atualização**. 1ed. Porto: Editora Universidade do Porto, 2003.

BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas. Editora da UNICAMP. 2003

BOELSMA E.; HENDRIKS H. F. J.; ROZA L. "Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids." **Am J Clin Nutr** 73: 853–64, 2001.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL_NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v.42, p.1-36, 2003.

BRANDT, F. S.; CAZZANIGA, A.; HANN, M. Cosmeceuticals: Current trends and market analysis. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, p. 141-143, 2011.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v.35, p.1827-1840, 2012.

CALLEGOS, C.; FRANCO, J. M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceutical. **Current Opinions in Colloids & Interface Science**, v.4, p.288-293, 1999.

CAMPOS, L. F. A.; AMORIM, L. V.; FERREIRA, H. C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte II: Composições ternárias. **Cerâmicas**, v. 53, p. 68-73, 2007.

CAO-HOANG, L.; FOUGÈRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v.124, p. 42-49, 2011.

CASTRO, I. A.; MORAES BARROS, S. B.; LANFER MARQUEZ, U. M.; MOTIZUKI, M.; HIGASHI SAWADA, T. C. Optimization of the antioxidant capacity of a mixture of carotenoids and α -tocopherol in the development of a nutritional supplement. **Food Res. Int.**, v. 38, p.861-866, 2005.

CARBALLO, J. L. HERNANDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect "in vitro" cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CARNEIRO, G. **Lipossomas contendo paromomicina: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeação cutânea in vitro**. 2007, 71 (Dissertação). Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte.

CARVALHO, A. K. F., **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 2011. 105f. Dissertação (Mestre em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.

CARVALHO, A. G. S.; SILVA, V. M.; HUBINGER, M. D. Microencapsulation by spray drying of emulsified green coffee oil with two-layered membranes. **Food Research International**. v. 61, p. 236-245, 2014.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 20-22, 2000.

CHIARI, B. G.; TROVATTI, E.; PECORARO, E.; CORREA, M. A.; CICARELLI, R. M. B.; RIBEIRO, S. J. L.; ISAAC, V. L. B. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 389-393, 2014.

CHIEN, W. Y. **Novel drug delivery systems**. 2^a ed. M Dekker. New York, 1992.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J.; **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. 2 ed. Ed. Taylor & Francis Group, 2008.

CONTRI, R.V.; FIEL, L. A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Transport of substances and nanoparticles across the skin and in vitro models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: Beck RCR; Guterres SS; Pohlmann A. (Org.). **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. 1 ed. Heidelberg, v. 1, p. 3-35, 2011.

CORDEIRO, A. M. T. M.; MEDEIROS, M. L.; SILVA, M. A. A. D.; SILVA, I. A. A.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. L.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 114, p. 827-832, 2013.

D'AMELIO, N.; ANGELIS, E.; NAVARINI, L.; SCHIEVANO, E.; MAMMI, S. Green coffee oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 110, p. 118-127, 2013.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Moisturizing effect os cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Res Technol**, v.12, 2006.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 204-213, 2005.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; SANTOS, N. A.; ROSENHAIN, R.; MARQUES, A. L. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Terma and kinetic study of corn biodiesel obtained by the methanol and ethanol routes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 87, n.3, p. 835-839, 2007.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Cienc. Cult.**, v.65, p. 28-31, 2013.

DI MAMBRO, V, M.; FONSECA M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37: 287-295, 2005.

DIMA, S.; DIMA, C.; IORDACHESCU, G. Encapsulation of functional lipophilic food and drug biocomponents. **Food Eng. Rev**, 2015.

ELKORDY, A. A.; ESSA, E. A. Effects of Spray Drying and Spray Chilling on Ibuprofen Dissolution. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6 (1), p. 3-12, 2010.

ESQUIVEL, M. M.; RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G. Relations between Oxidative Stability and Antioxidant Content in Vegetable Oils Using an Accelerated Oxidation Test – Rancimat. **Chemical Product and Process Modeling**. v. 4 (10), 2009.

FERRARI, M.; OLIVEIRA, M. S. C.; NAKANO, A. K.; ROCHA-FILHO, P. A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Bras. De Farmacognosia**. v. 17, p. 626-630, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FOLSTAR P. *Lipids*. **Elsevier Applied Science**. v.1, p.203-222., 1985.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of the in vitro data. **J. Invest. Dermatol**. v. 64, p 190-195, 1975.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPO, P. M. B. G. Evaluation of the protective effect of alphanatocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. **IFSCC Magazine**, v. 6, p. 213-217, 2003.

GIANETI, M. D.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Avaliação da eficácia de formulações cosméticas contendo extratos proteicos de trigo e soja por técnicas de biofísica e microscopia confocal a laser. **Revista Brasileira de Medicina**. Especial Dermatologia 1, abr. 2012.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, p. 1490-1498, 2008.

GUIMARÃES, K. L.; RÉ, M. I. Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC). In: Beck RCR; Guterres SS; Pohlmann A. (Org.). **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. 1 ed. Heidelberg, v. 1, p. 101-104, 2011.

HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Bioconvertible vitamin antioxidants improve sunscreen photoprotection against UV-induced reactive oxygen species. **J Cosmet Sci**, v. 54, p. 589-598, 2003.

HASSEL, R. L. Thermal analysis: na alternative method of measuring oil stability. **Journal of the American oil Chemists Society**, v.53, p. 179-181, 1976.

HOATH, S.B.; LEAHY, D. G. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. **Human Epidermis Organization**, v. 21, n. 6, p.1440-1446, 2003.

HOULI, L.; XIAOBIN, Z.; YUKUN M.; GUANGXI, Z. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 238–244, 2009.

IDSON, B. Vitamins and the skin. **Cosm Toil**.v. 108, p. 79-94, 1993.

ILIC, I.; DREU, R.; BURJAK, M.; HOMAR, M.; KERK, J.; SRCIC, S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 176–183, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.

JACOBI U, TASSOPOULOS T, SURBER C, LADEMANN J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. **Arch Dermatol Res.**, v. 297, p.303–310, 2006.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, p.390-401, 2002.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2. N. 4, p. 59-62, 2007.

KAUR, C. D.; SARAF, S. *In vitro* sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. **Pharmacognosy Research**, v. 2 (1), p. 22-25, 2010.

KILLEN, M. J. The process of spray drying and spray congealing. **Pharmaceutical Engineering**, v. 13, p. 56-64, 1993.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Quim. Nova**, v. 33, p.295-300, 2010.

KUMAR, S. Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. **Technovation**, v. 25, p. 1263-1272, 2005.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. Boletim do CEPPA, v. 19, n. 2, p. 319-340, 2001.

LAGO, R. C. A.; FREITAS S. P. Extração dos óleos de café verde e da borra com etanol comercial. **Comunicado técnico 92 – EMBRAPA**, p.1-6, 2006.

LEONARDI, G. R.; GASPAR L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. Applications of a non invasive method to study moisturizing effect of formulations containing vitamin A or E or ceramide on human skin. **J Cosmet Sci**, v.53, p 263-268, 2002.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; DOS SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (orbignya sp.) obtido por via etanólica. **Quim. Nova**, v. 30, p. 600-603, 2007.

LIRA, A. A. M. **Estudo de permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol**. 2003. 81f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MACCARI, F. L. R. **Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* e estabilidade de emulsões contendo (-)-Terpinen-4-ol**. 2011. 132. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MACHADO, M. O. **Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por *spray congealing***. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; GONÇALVES, G. M. S.; GASPAR, L. R. In vitro atioxidant activity and in vivo efficacy of topicalformulations containing vitamin and its derivatives studied by non-invasive methods. **Skin Research and Technology**, v.14, 376-380, 2008.

MAIER H. G.; MÄTZEI U. Atractyligenin und seine Glykoside im Kaffee. In: **10th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, 247-51, ASIC, Paris, 1982.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Na Bras Dermatol**, v. 61, n. 3, p. 167-172, 1986

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI (2), p. 01-37, 2009.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy**. Philadelphia, Lea & Febiger, 4ed, p-153-476, 1993.

MARTINELLO, T.; KANECO, T. N.; VELASCO, M. V. R.; TAQUEDA, M. E. S.; CONSIGLIERI, V. O. Optimization of poorly compactable drug tablets manufactured by direct compression using the mixture experimental design. **Int. J. Pharm.** v.332, p. 87-95, 2006

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JR, M. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Quím. Nova**, v. 23, p.251-256, 2000.

MARTINS, R. M. **Desenvolvimento de disperses sólidas microparticuladas contendo carbamazepina por spray congealing**. 2010. 166f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

MARTINS, R. M. **Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação fotoquimiopreventiva de uma formulação contendo associação de filtros solares e rutina**. 2014. 178f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MERCURIO, D. G. **Desenvolvimento e avaliação de eficácia de formulações fotoprotetoras para a pele oleosa contendo extrato de *Anacardium occidentale***. 2012. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. A.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLI, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31-34, 1982.

MCCARRON, P. A.; DONNELLY, R. F.; AL-KASSAS R. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the microencapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, p. 365-378, 2008.

MCLUCKEY, S. A.; MENTINOVA, M. Ion/Neutral, Ion/Electron, Ion/Photon, and Ion/Ion Interactions in Tandem Mass Spectrometry: Do We Need Them All? Are They Enough?. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, v. 22, p. 3-12, 2011.

MIYASHITA, K.; TAKAGI, T. Study on the Oxidative Rate and Prooxidant Activity of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 63, 1986.

MONTGOMERY, D. C. Introdução ao controle estatístico da qualidade. Rio de Janeiro: LTC, 2004.

NANJWADE, B. J. K.; PATEL, D. J.; PARIKH, K. A.; NANJWADE, V. K.; MANVI, F. V. Development and characterization of solid lipid microparticles of highly insoluble drug Sirolimus. **J. Bioequiv. Availab.**, v. 3, p. 11-15, 2011.

NAKAYAMA S.; KATOH E.M.; TSUZUKI T.; KOBAYASHI S. Protective effect of alpha-tocopherol-6-O-phosphate against ultraviolet B-induced damage in cultured mouse skin. **J Invest Dermatol** ; 121: 406–11., 2003.

NEMEN, D. **Sistemas nanoestruturados lipídicos contendo resveratrol: preparação, caracterização e avaliação da penetração cutânea**. 2010. 175p. (Dissertação) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

NISHIKAWA, D. O.; PERES D. A.; OLIVEIRA, C. A.; SILVA, V. R. L.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A R. Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin. **Biomed. Biopharm. Res.** v. 1, 91-100, 2013.

NOSARI, A. B. F. L. **Desenvolvimento de micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de café verde por *spray congealing***. 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

NOSARI, A. B. F. L.; LIMA, J. F.; SERRA, O. A.; FREITAS, L. A. P, Improved Green Coffee Oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. **Rev. Bras. Farmacogn.** Article in press, 2015.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

PAGLIARUSSI, R. S., BASTOS; J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid bed drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) extract: effect of process factors on caffeine content. **AAPS PharmaSciTech**. 7 (2), article - 54, 2006.

PARDAUIL, J. J. R.; SOUZA, L. K. C.; MOLFETTA, F. A.; ZAMIAN, J. R.; ROCHA FILHO, G. N.; COSTA, C. E. F. Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. **Bioresource Technology**, v.102, p. 5873–5877, 2011.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; ALBERTINI, B.; VOINOVICH, D.; MONEGHINI, M.; RODRIGUEZ, L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v. 88, p 263–275, 2003.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; PERISSUTI, B.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 92-102, 2006.

PASSERINI, N.; GAVINI, E.; ALBERTINI, B.; RASSU, G.; SABATINO, M. D.; SANNA, V.; GIUNCHEDI, P.; RODRIGUEZ, L. Evaluation solid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 559-567, 2009.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; GRASSI, M.; RODRIGUEZ, L.; GRAIC, D. Q. M.; Solid lipid microparticles produced by spray congealing: influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99 (2), p. 916-931, 2010.

PEREDA, M. D. C. V.; DIEAMANT, G. C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; COLOMBI, D.; DI STASI, L. C.; DE SOUZA QUEIROZ, M. L. S. Effect of green *Coffea arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in 'in vitro' and 'ex vivo' human skin models. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, p. 56-62, 2009.

PEREIRA, S. V. **Obtenção de dispersões sólidas microparticuladas de piroxicam por spray congealing**. 2012. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PERGE, L.; ROBITZER, M.; GUILLEMOT, C.; DEVOISSELE, J. M.; QUIGNARD, F.; LEGRAND, P. New solid lipid microparticles for controlled ibuprofen release: formulation and characterization study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, p. 59-67, 2012.

PITAKSUTTEEPONG T., SOMSIRI A., WARANUCH N. Targeted transfollicular delivery of artocarpin extract from *Artocarpus incises* by means of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics an Biopharmaceutics**, v. 67, p.639-645, 2007.

POISSON, J. Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert. In: **Colloque Scientifique International sur le Café**, 8., pp. 33-58, 1977, *Abidjan. Annals ASIC*, Paris, pp. 33-58, 1979.

PROST-SQUARCIONI, C. Histology of skin and hair follicle. **Medical Science**, v. 22 n. 2, p. 131-137, 2006.

PROW, T. W.; GRICE, J. F.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER W.; WURM, E. M. T; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, 470-491, 2011.

QUINA, F. H. **Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos**. *Quím. Nova* [online]. 2004, vol.27, n.6, pp. 1028-1029. ISSN 0100-4042

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; BIZARRI, C. H. B.; MATTOS, H. A.; PADILHA, M. R. S.; DUART, H. M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 18, p. 87–101, 1996.

REIFENRATH, W. G.; HAWKINS, G. S.; KURTZ, M.S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: An *in vitro-in vivo* study. **J. Pharm. Sci.**,80, p. 526-532,1991.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. Planejamento experimental para misturas utilizando cromatografia em papel. **Química Nova**. v. 19, p. 313-319, 1996.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamentos de experimentos e otimização de processos**; Campinas, SP. Casa do Espírito Amigo Fé e Amor, 2 ed., 2009

ROY, S. D.; GUTIERREZ M.; FLYNN G. L.; CLEARY, G. W. Controlled transdermal delivery of fentanyl: characterizations of pressure-sensitive adhesives for matrix patch design. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, pp. 491–495, 1996.

RUDNIK, E.; SZCZUCINSKA, A.; GWARDIAK, H.; SZULC A.; WINIARSKA, A. Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. **Therm. Acta**. v. 370, p. 135-140, 2000.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, L. A. Biological screening of Annonaceos Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**, v.10, n.2-3, p. 209-212, 2003.

SARKA, M.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Developmente and validation of RP-HPLC and ultravioleta spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antirretroviral grugs in pharmaceuictl dosage forms. **J. Chromatog. B.**, v. 830 (2), p. 349-354, 2006.

SAVIAN, A. L.; VARELLA, F. T.; ATAYDE, M. L.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Rev. Bras. Farm.**, v 91(2), p. 82-88, 2011.

SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. Follicular penetration. **Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling** IBC Technical Services London 1990 163-173.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, 2003.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, 2005.

SEIXAS, V. C. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e eficácia de formulações cosméticas contendo fostato de cério com propriedades fotoprotetoras**. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 154p, 2014.

SEOLATTO, A. A.; TAVARES, C. R.; COSSICH, E. S.; DA SILVA, E. A.; GUEDES, T. A. Planejamento experimental estatístico para a otimização das condições em batelada de dessorção de níquel da alga marinha *Sargassum filipendula*. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, n. 2, p. 207-214, 2009.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 01-20, 2003.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, 22(1): 94-103, 1999.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C. SOUZA, M. S. R. DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 31, p. 125-131, 2010.

SILVA, V. M.; VIEIRA, G. S.; HUBINGER, M. D. Influence of different combinations of wall materials and homogeneisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. **Food Research International**. v. 61, p. 132-143, 2014.

SHIM, J.; SEOK KANG, H.; PARK, W. S., HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 477-484, 2004.

SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J. T., L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 109, p. 145-149, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. XY (00): p. 1-8, 2011.

SOUZA, V. B.; Ferreira, J. R. N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.31, p. 217-222, 2010.

SOUZA, A. G.; SANTOS, J. C. O.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, M. C. D.; PRASAD, S. A Thermoanalytic and Kinetic Study of Sunflower Oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 21, p. 265-273, 2004.

SPEER, K.; KOLLING-SPEER, I. *The lipid fraction of the coffee bean*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p. 201-216, 2006.

STEDFELDT, E.; CUNHA, D. T.; BANDONI, D. H.; OLIVEIRA, A. B. A.; TONDO, E. C.; SACCOL, A. L. F.; GINANI, V. C.; SILVA-JUNIOR, E. A. **Comparação de temperaturas de alimentos e preparações utilizando o termômetro tipo digital espeto e termômetro tipo digital vermelho**. Relatório Técnico. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013

SUN, J.; BI, C.; CHAN, H. M.; SUN, A.; ZHANG, Q.; ZHENG, Y. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p.367–375, 2013.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**, 2009. 142f. Tese (doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

TEHRANY, E. A.; JACQUOT, M.; GAIANI, C.; IMRAN, M.; DESOBRY, S.; LINDER, M. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**. v., 2011.

TOLL, R. JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **J. Invest. Dermatol.** v. 123. p. 168-176, 2004.

TURSILLI, R.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; SCALIA, S. Solid lipid microparticles containing the sunscreen agente, octyl-dimethylaminobenzoate: effect of the vehicle. **European Journal of Pharmaceutical and biopharmaceutics**, v. 66, p. 483-487, 2007.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.49, p. 311–322, 2013.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, p. 23-7, 2008.

VELAZQUEZ-PEREDA, M. D. C.; DIETMANT, G. C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; COLOMBI, D.; STASI, L. C.; QUEIROZ, M. L. S. Effect of green *Coffea arábica* L. seed oil on extracellular matrix components abd

water channel expression. In *n vitro* and *ex vivo* human skin models. **J. Cosmet. Dermatol.** V. 8; p.56-62, 2009.

VIJAYAN, V.; AAFREEN, S.; SAKTHIVEL, S.; RAVINDRA REDDY, K. Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded Neem oil for topical treatment of acne. **Journal of Acute Disease**, v. 2, p. 282–286, 2013.

WAGEMAKER, T. A. L. **Variabilidade do teor de óleo, de seu fator de proteção solar de outros componentes da fração lipídica do gênero *Coffea* visando usos alternativos aos grãos.** 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.

WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; GUERREIRO FILHO, O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**. v. 33, p. 469-473, 2011.

WAGEMAKER, T. A. L. **Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora**, 2013. 99f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

WAGEMAKER, T. A. L.; ROSADO, C.; ANDRADE, J. P.; FERNANDES, A. S.; RIJO, P.; MAIA CAMPOS, P.; RODRIGUES, L. M. Evaluation of the sensory properties of a cosmetic formulation containing green coffee oil. **Biochemical and Biopharmaceutical Research**. v. (10)1, p. 101-108, 2013.

WAGEMAKER, T. A. L.; SILVA, S. A. M.; LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Green *coffee arabica* L. seed oil influences the stability and protective effects of tropical formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 34-40, 2015.

WAGEMAKER, T. A. L.; RIJO, P.; RODRIGUES, L. M.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; FERNANDES, A. S.; ROSADO, C. Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. **Cosmetic Science**, p.1-5, 2015.

WANG, B.; FENG, W. Y.; WANG, T. C.; JIA, G.; WANG, M.; SHI, J. W.; ZHANG, F.; ZHAO, Y. L.; CHA, Z. F. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. **Toxicol. Lett.**, v. 161, p. 115-123, 2006.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MAD, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 176-185, 2007.

WYSOCKI, A. B. Skin anatomy, physiology and pathophysiology. **The nursing clinics of North America**, v. 34, n. 4, p.777-797, 1999.