UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L).

Luciana Carvalho Agostinho

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Luciana Carvalho Agostinho

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 07/04/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Agostinho, Luciana Carvalho

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L). Ribeirão Preto, 2017.

103 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves

1. Nanoemulsão. 2. Óleo de café verde. 3. Óleo de urucum.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Carvalho Agostinho

Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L).

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*À todas as mulheres que fazem ciência no Brasil e no mundo,
mesmo tendo que provar pluralmente sua capacidade a cada dia.
Obrigada por não desistirem. Meu eterno respeito e gratidão por
pavimentarem o caminho por onde agora eu também sigo.*

Agradecimentos

Ao meu marido, **Marcelo Duarte Ferrari**, agradeço o amor, o apoio, a incrível compreensão pelos momentos ausentes e as palavras duras nos momentos precisos. Agradeço, sobretudo, por ser meu melhor amigo nessa viagem. Eu nunca chegaria tão longe se você não estivesse ao meu lado.

Aos meus pais, **Alceni** e **Arlene**, que sempre me estimularam a continuar estudando, pois sabem quanto o conhecimento me encanta. Sempre valorizando o esforço e a perseverança nos estudos, me fizeram acreditar no valor da educação e do conhecimento. Esta realização também é de vocês.

Às minhas irmãs **Andréa** e **Fernanda**, por me conhecerem em profundidade e acreditarem sempre no que há de melhor dentro de mim. O apoio de vocês me incentiva a continuar sempre.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho**, por acreditar e apostar em mim. Minha eterna gratidão pela sua generosidade, pelo seu carinho e por ter escolhido, dentre tantos caminhos que a vida apresenta, o caminho que possibilitou compartilhar conosco seus conhecimentos e sua sabedoria.

Aos amigos e amigas do **Kosmos**, pelo auxílio, pelas conversas, por dividirem seus conhecimentos comigo, para juntos nos tornarmos mais sábios. Agradeço por poder compartilhar esta realização com vocês.

Às professoras **Dra. Maria José Vieira Fonseca** e **Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez**, por possibilitarem a realização de experimentos em seus laboratórios. Agradeço pela receptividade da acolhida e pelos ensinamentos compartilhados.

À **Prof. Dra. Vera Lucia Borges Isaac**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Câmpus de Araraquara, pela disponibilidade, atenção, amizade e por abrir as portas de seu laboratório para auxiliar na realização deste

trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, seus professores, colaboradores e funcionários, que trabalham diariamente e incansavelmente pelo ensino e pela pesquisa neste país, por estarem presentes durante minha formação, facilitando meu caminho e compartilhando seus conhecimentos. Minha eterna gratidão a essa que também é minha casa.

RESUMO

AGOSTINHO, L.C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L).** 2017. 103 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Nanoemulsões são dispersões coloidais caracterizadas por apresentarem glóbulos de tamanho nanométrico, o que lhes confere estabilidade cinética e habilidade em promover melhora na absorção de substâncias ativas pela pele. A hidratação adequada e a proteção contra as agressões do ambiente são pontos críticos para manutenção de uma pele saudável. A riqueza da biodiversidade brasileira apresenta-se como imensurável fonte de matérias primas e os óleos vegetais são um grande exemplo, por apresentarem compatibilidade e conferir emoliência e oclusividade à pele. O óleo de urucum é amplamente utilizado pela indústria de alimentos e cosmética, atóxico e tem propriedades antioxidantes, sendo utilizado como adjuvante de filtros solares. O óleo de café é rapidamente absorvido pela pele e apresenta ação antioxidante e estimulante da síntese de colágeno e elastina. Neste projeto estudamos a formulação de uma nanoemulsão aditivada, pelo método de inversão de fases, contendo óleo de urucum e óleo de café, com o objetivo de conferir ao produto final propriedades hidratantes, antioxidantes e auxiliares na proteção contra os efeitos nocivos da radiação solar. A nanoemulsão aditivada mostrou-se estável e com características desejáveis como boa capacidade oclusiva, valor de pH compatível com a pele e perfil de viscosidade pseudoplástico. Submetida a análise sensorial por painel treinado, foi considerada aprovada, quando comparada ao produto comercial.

Palavras-chave: cosmético, óleo de café, óleo de urucum, nanoemulsão, EHL, análise sensorial.

ABSTRACT

AGOSTINHO, L.C. **Development and evaluation of a cosmetic nanoemulsion, prepared using annatto (*Bixa orellana*, L) and green coffee (*Coffea arabica*, L) oils** 2017. 103 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Nanoemulsions are colloidal dispersions characterized by their nanometric particle size that grant kinetic stability and improves the topical delivery of active substances. Proper hydration and protection from environmental aggression are critical conditions for healthy skin. Brazilian biodiversity is an immeasurable source of raw material; vegetable oils are a good example of that, due to skin compatibility and their ability to sooth, grant occlusion and skin glow. Annatto oil is widely used in food and cosmetics industries for its lack of toxicity and antioxidant properties as well as adjuvant to sunscreen. Green coffee oil shows fast skin absorption, antioxidant properties, and promotes collagen and elastin synthesis. The aim of this project was to study the formulation of a nanoemulsion with Annatto and Green coffee oils, plus additives, to grant the final product hydration, antioxidant and sunscreen adjuvant characteristics. The product showed stability and desirable characteristics, such as occlusive capacity, skin-compatible pH value and pseudoplastic viscosity profile. Submitted to sensory analysis, the additivated nanoemulsion showed good acceptability by a trained panel when compared to a commercial product.

Keywords: cosmetics, green coffee oil, annatto oil, nanoemulsion, HLB, sensory analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da pele e suas camadas.	19
Figura 2 - Representação da pele e seus estratos.	20
Figura 3 - Aspecto dos grãos verdes de café (não torrados).....	26
Figura 4 - Aspecto do fruto e das sementes de urucum.	28
Figura 5 - Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões.	31
Figura 6 - Representação do processo de instabilidade <i>Ostwald ripening</i>	33
Figura 7 - Representação da organização das moléculas do tensoativo nos glóbulos da nanoemulsão.	36
Figura 8 - Representação do método 1 de preparo da emulsão.	47
Figura 9 - Representação do método 2 de preparo da emulsão.	47
Figura 10 - Representação do método 3 de preparo da emulsão.	48
Figura 11 - Representação do método 4 de preparo da emulsão.	49
Figura 12 - Representação do método 5 de preparo da emulsão.	49
Figura 13 - Exemplos de emulsões consideradas instável (1), evidenciando a cremação,	52
Figura 14 - Mecanismo de inversão da curvatura do tensoativo e formação dos glóbulos da nanoemulsão.	68
Figura 15 - Distribuição de tamanho por intensidade da nanoemulsão preparada a 600 rpm..	69
Figura 16 - Distribuição de tamanho por intensidade da emulsão preparada a 900 rpm.	69
Figura 17 - Distribuição de tamanho por intensidade da nanoemulsão preparada a 1.200 rpm.	70
Figura 18 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par J de tensoativos (<i>Ceteareth 20/Ceteareth 5</i>).	72
Figura 19 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par N de tensoativos (<i>Steareth 21/Steareth 2</i>).	73
Figura 20 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par D de tensoativos (<i>Ceteareth 20/Steareth 2</i>).	73
Figura 21 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par O de tensoativos (<i>Steareth 21/Ceteareth 5</i>).	74
Figura 22 - Aspecto das nanoemulsões aditivadas, com diferentes proporções de modificador reológico, evidenciando a sedimentação na formulação 2.	78

Figura 23 - Distribuição de tamanho por intensidade das amostras de nanoemulsão aditivada.	80
Figura 24 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo de café verde.	83
Figura 25 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo de urucum.	84
Figura 26 - Curva de calibração da atividade antioxidante da mistura de óleos de café e urucum, na proporção 2:1.	84
Figura 27 - Relação entre a porcentagem de redução da atividade do DPPH e a concentração dos óleos de café e urucum e a mistura dos óleos, na proporção 2C:1U.	86
Figura 28 - Análise do MPF da nanoemulsão, nos diversos comprimentos de onda.	87
Figura 29 - Análise do MPF da nanoemulsão aditivada, nso diversos comprimentos de onda.	88
Figura 30 - Perda de água por minuto antes da aplicação das nanoemulsões.	89
Figura 31 - Perda de água por minuto após a aplicação das nanoemulsões.	89
Figura 32 - Perfil de viscosidade da nanoemulsão aditivada.	91
Figura 33 - Caracterização sensorial da NA e NA aditivada, comparadas com o produto comercial.	92
Figura 34 - Teste de aceitação da NA aditivada, em comparação ao produto comercial.	93
Figura 35 - Teste de intenção de compra da NA, em comparação ao produto comercial.	93
Figura 36 - Teste de preferência, comparando a NA com o produto comercial.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da fração lipídica do grão de café (<i>Coffea arabica</i> , L.).	27
Tabela 2 - Composição da fração lipídica do óleo de urucum (<i>Bixa orellana</i> , L.).	29
Tabela 3 - Composição da nanoemulsão.	45
Tabela 4 - Proporção dos óleos de café e urucum utilizadas para a determinação.	46
Tabela 5 - Composição da nanoemulsão aditivada.	51
Tabela 6 - Pares de tensoativos utilizados na determinação dos valores de EHL dos óleos de café e urucum.	59
Tabela 7 - Avaliação macroscópica das emulsões preparadas com 5,0 % de óleo de café, com os pares de tensoativos utilizados.	60
Tabela 8 - Avaliação macroscópica das emulsões preparadas com 5,0 % de óleo de urucum, com os pares de tensoativos utilizados.	60
Tabela 9 - Pares utilizados na determinação do sistema tensoativo.	63
Tabela 10 - Proporções dos óleos de café e urucum utilizadas nas emulsões preparadas para determinação do valor de EHL_{req} .	64
Tabela 11 - Análise macroscópica das emulsões preparadas com a mistura dos óleos de café e urucum, com os pares de tensoativos utilizados.	65
Tabela 12 - Soluções utilizadas para escolha da proporção entre o modificador reológico e o filtro físico.	71
Tabela 13 - Composição da nanoemulsão.	75
Tabela 14 - Análise da nanoemulsão submetida ao ciclo gela-degela.	77
Tabela 15 - Tamanho de partícula e PDI das amostras de nanoemulsão aditivada.	79
Tabela 16 - Análise da nanoemulsão aditivada submetida ao ciclo gela-degela.	82
Tabela 17 - Valores de IC_{50} dos óleos.	85
Tabela 18 - Valores de oclusividade das nanoemulsões.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	<i>Antimicrobial peptides</i> Peptídeos antimicrobianos
A/O	Água em Óleo
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPPH•	radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EHL _{req}	Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo requerido
EPI	<i>Emulsion Phase Inversion</i> Emulsão por inversão de fase
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor</i> Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
FPS	Fator de Proteção Solar
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i> Concentração inibitória 50
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
MPF	Monochromatic Protection Factor Fator de proteção monocromática
NE	Nanoemulsão
NMF	<i>Natural Moisturizing Factor</i> Fator de hidratação natural
O/A	Óleo em Água
C	Óleo de café
U	Óleo de urucum
PCA	<i>Pyrrolidone Carboxylic Acid</i> Ácido Pirrolidona Carboxílico
PdI	<i>Polidispersion Index</i> Índice de Polidispersividade

PIC	<i>Phase Inversion Composition</i> Composição de Inversão de Fase
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i> Temperatura de Inversão de Fase
TA	Tensoativo
TEWL	<i>Transepidermal Water Loss</i> Perda Transepidérmica de Água
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor -- beta</i> Fator de Transformação do Crescimento -- beta
TP	Tamanho de partícula
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

1. Introdução	18
1.1. A pele	18
1.1.1. A epiderme	19
1.1.2. A derme	21
1.1.3. O fator de hidratação natural da pele	22
1.1.4. A função protetora da pele	23
1.2. Óleos vegetais	25
1.2.1. Óleo de café verde.....	26
1.2.2. Óleo de urucum	27
1.3. Emulsões	29
1.3.1. Processos de instabilidade de emulsões	30
1.3.2. Nanoemulsões	31
1.3.2.1. Métodos de obtenção de NEs	34
1.3.2.1.1. Métodos de alta energia.....	34
1.3.2.1.2. Métodos de baixa energia	34
1.4. O sistema Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL)	37
2. Objetivos.....	39
2.1. Objetivo Geral	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. Material e métodos	40
3.1. Material	40
3.1.1. Fase Oleosa	40
3.1.1.1. Óleo de Café Verde	40
3.1.1.2. Óleo de Urucum	40
3.1.2. Fase Aquosa	40
3.1.3. Tensoativos	40
3.1.3.1. Hidrofílicos:.....	40
3.1.3.2. Lipofílicos	42
3.1.4. Modificador reológico:.....	42
3.1.5. Ativos	43
3.1.5.1. Hidratante	43

3.1.5.2. Ativo “retinóide-like”	43
3.1.6. Filtro solar físico	43
3.1.7. Conservante microbiológico	43
3.1.8. Equipamentos	43
3.2. Métodos	45
3.2.1. Preparo da nanoemulsão	45
3.2.2. Determinação do valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo) requerido	45
3.2.3. Determinação do sistema tensoativo	46
3.2.4. Influência da ordem de adição no processo de obtenção das emulsões	46
3.2.5. Influência da velocidade de agitação na estabilidade e no tamanho de partícula	50
3.2.6. Determinação do tipo de emulsão: teste de diluição	50
3.2.7. Preparo da nanoemulsão aditivada	50
3.2.8. Teste de estabilidade	51
3.2.8.1. Testes preliminares de estabilidade	51
3.2.8.1.1. Avaliação macroscópica e centrifugação	52
3.2.8.1.2. Determinação do tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade	52
3.2.8.1.3. Determinação do valor do pH	53
3.2.8.1.4. Determinação da condutividade elétrica	53
3.2.8.1.5. Estresse térmico	53
3.2.8.1.6. Ciclo gela-degela	53
3.2.9. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos óleos por DPPH	53
3.2.10. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante da nanoemulsão aditivada por DPPH	54
3.2.11. Avaliação <i>in vitro</i> do Fator de Proteção Solar (FPS)	55
3.2.12. Avaliação da oclusividade da emulsão	55
3.2.13. Avaliação do perfil de viscosidade dinâmica da nanoemulsão aditivada	56
3.2.14. Análise sensorial	56
4. Resultados e Discussão	58
4.1. Preparo da nanoemulsão	58
4.2. Determinação do valor de EHL requerido dos óleos de café, urucum e da mistura dos óleos	58
4.2.1. Emulsões preparadas com óleo de café	59
4.2.2. Emulsões preparadas com óleo de urucum	60
4.2.3. Emulsões preparadas com a mistura de óleos de café e urucum	61
4.3. Determinação do sistema tensoativo	62

4.4. Influência da ordem de adição no processo de obtenção das emulsões	66
4.5. Influência da velocidade de agitação na estabilidade e no tamanho de partícula	68
4.6. Determinação do tipo de emulsão: teste de diluição	70
4.7. Preparo da nanoemulsão aditivada	70
4.8. Teste de estabilidade	72
4.8.1. Testes preliminares de estabilidade das nanoemulsões.....	72
4.8.1.1. Avaliação macroscópica.....	72
4.8.1.2. Determinação do tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade.....	72
4.8.1.3. Determinação do valor de pH.....	75
4.8.1.4. Estresse térmico.....	75
4.8.1.5. Ciclo gela-degela.....	76
4.8.2. Testes preliminares de estabilidade da nanoemulsão aditivada	78
4.8.2.1. Avaliação macroscópica.....	78
4.8.2.2. Determinação do tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade.....	79
4.8.2.3. Estresse térmico.....	81
4.8.2.4. Ciclo gela-degela.....	81
4.8.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	83
4.8.3.1. Óleos de café e urucum e da mistura de óleos.....	83
4.8.3.2. Nanoemulsão e nanoemulsão aditivada.....	86
4.8.4. Avaliação <i>in vitro</i> do Fator de Proteção Solar	87
4.8.5. Avaliação da oclusividade da emulsão	89
4.8.6. Avaliação do perfil de viscosidade da nanoemulsão aditivada	91
4.8.7. Análise sensorial	92
5. Conclusões.....	95
6. Bibliografia.....	96

1. Introdução

1.1. A pele

A pele é um órgão complexo que recobre toda a superfície do corpo humano, correspondendo a 16% do seu peso total, e que está constantemente exposta às condições ambientais. É um órgão especializado que protege o organismo contra a perda de água para o ambiente, o estresse mecânico e participa da resposta do sistema imunológico contra a penetração de agentes químicos e patógenos, graças à sua elaborada estrutura, que associa tecidos de origens epitelial, conectivo, vascular, muscular e nervoso. Participa, ainda, da regulação da temperatura corporal e da função sensorial de detecção de estímulos de toque, vibração, pressão, temperatura, dor e prurido (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010; KHAVKIN; ELLIS, 2011; SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011).

A função de barreira da pele previne a penetração de substâncias tóxicas e capazes de causar reações alérgicas no organismo. Para que essa função não seja comprometida, faz-se necessária a manutenção de um nível de hidratação que permita a renovação das células, tornando o controle da hidratação como fator central para a fisiologia e aparência saudáveis da pele (BONTÉ, 2011).

Outra função não menos importante da pele é sua contribuição para a aparência pessoal. Uma pele bonita e saudável demonstra cuidado com a saúde e autoestima. Mudanças como aparecimento de rugas ou manchas e perda de elasticidade, causadas pelo envelhecimento intrínseco (resultante da passagem do tempo) e pelo envelhecimento extrínseco (causado por influências externas como a exposição à radiação ultravioleta), promovem a busca pelos consumidores a tratamentos e procedimentos cosméticos para melhorar a aparência da pele (KHAVKIN; ELLIS, 2011; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011).

A pele é organizada em duas camadas: a epiderme e a derme (figura 1). Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, ou tecido subcutâneo, que não faz parte da pele mas serve de união aos órgãos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A estrutura da pele apresenta variações nas diversas regiões do corpo, com relação à espessura, à distribuição de estruturas anexas (pelo, unhas, cabelo) e conteúdo de melanina, entre outros. Além disso, fatores genéticos, envelhecimento e a exposição a fatores externos como radiação ultravioleta ou cigarro podem alterar a estrutura e a fisiologia da pele e, conseqüentemente, sua aparência (KHAVKIN; ELLIS, 2011; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011).

As características da pele variam de acordo com topografia, pH, temperatura, hidratação e microbiologia das diversas regiões do corpo. No rosto, por exemplo, a espessura da pele pode variar de 0,1 mm na pálpebra até 1 mm na região acima dos lábios. Além disso, a pele pode apresentar diferentes propriedades mecânicas dependendo da região e da forma como está ligada aos músculos ou tecidos internos. Na cabeça, pescoço e membros, muitos ligamentos ancoram a pele no tecido muscular, permitindo à pele adequar-se ao movimento dessas regiões. Já no abdômen, a menor quantidade de ligamentos facilita a alteração de volume pelo acúmulo de gordura (WONG et al., 2016).

Figura 1 - Representação esquemática da pele e suas camadas.

Fonte: <http://escolakids.uol.com.br/public/upload/image/camadas-pele.jpg>

1.1.1. A epiderme

A epiderme é um epitélio escamoso e estratificado, em constante renovação. É formada majoritariamente por queratinócitos, células ricas em queratina que, ao deslocarem-se desde a base da epiderme até a superfície corporal externa, formam as diferentes camadas, ou estratos da pele (figura 2) (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta três outros tipos de células: os melanócitos, que são células produtoras de melanina, as células de Langherhans, que fazem parte do sistema imunológico e as de Merkel, que atuam na recepção de estímulos táteis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 2 - Representação da pele e seus estratos.

(Fonte: <https://www.todamateria.com.br/pele-humana>)

O **estrato basal** geralmente é constituído por apenas uma camada de queratinócitos, de formato cubóide, que se ancoram na membrana basal. O estrato basal é rico em células tronco e apresenta intensa atividade mitótica sendo responsável, juntamente com o estrato espinhoso, pela constante renovação da epiderme. As células do estrato basal contêm filamentos de queratina que vão se tornando mais numerosos à medida que a célula migra para as camadas mais externas da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010; SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011).

Os melanócitos estão presentes na camada basal, representando 5-10% da população celular deste estrato. São responsáveis pela produção de melanina, pigmento de cor marrom-escura sendo um dos fatores que definem a cor da pele, juntamente com a quantidade de capilares na derme e a cor do sangue nesses capilares. A melanina é produzida e estocada nos melanossomos (vesículas formadas no aparelho de Golgi), pela ação da enzima tirosinase. Quando estão repletos de melanina, os melanossomos perdem a atividade enzimática e são chamados de grânulos de melanina. Esses grânulos são transportados pelos dendritos dos melanócitos até o citoplasma dos queratinócitos adjacentes, onde formam uma proteção em forma de guarda chuva sobre o núcleo (posição supranuclear), protegendo contra os efeitos

danosos da radiação UV (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Células de Merkel também são encontradas na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos e são mecano-receptores, associadas à sensibilidade tátil da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O **estrato espinhoso** é formado devido ao deslocamento das células do estrato basal em direção à superfície da pele. As células apresentam-se poliédricas e são ligadas por desmossomos, estruturas que mantêm firmemente unidas, através de proteínas, duas células vizinhas. Células de Langerhans também estão presentes nesse estrato, que tem a espessura correspondente a 3 ou 4 camadas de células.

As células de Langerhans são células do sistema imune que correspondem a 3 a 6% das células da epiderme. Essas células capturam os antígenos depositados na pele e os apresentam às células T, para ativação da resposta imune. Durante uma reação alérgica a população destas células aumenta podendo diminuir significativamente com a idade e a exposição solar, tendo papel importante no desenvolvimento de carcinomas em indivíduos mais velhos e com a pele danificada pelo sol (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

No **estrato granuloso** os queratinócitos contêm grânulos de queratohialina. Essas células eliminam componentes lipídicos ao espaço intercelular, que são importantes na função de barreira da pele e na coesão do estrato córneo.

O **estrato córneo** é a camada mais externa da epiderme, formada por células chamadas corneócitos, que são queratinócitos que migraram do estrato granuloso e perderam o núcleo e as organelas citoplasmáticas. São achatadas e ricas em filamentos de queratina. O estrato córneo é formado por várias camadas de corneócitos e com espessura variável em função da região do corpo sendo que essas células desprendem-se, no processo natural de descamação da pele.

O tempo médio para uma célula migrar do estrato basal para o estrato córneo e desprender-se da pele é de 28 dias, porém doenças e outros processos podem alterar esse prazo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

1.1.2. A derme

A derme é o tecido conjuntivo onde a epiderme se apoia, sendo delimitada externamente pela epiderme e internamente pela hipoderme ou tecido subcutâneo. Com espessura variável conforme a região do corpo, tem menos de 1 mm nas pálpebras e cerca de 5 mm na região das costas. Logo abaixo da epiderme está localizada a chamada derme papilar

apresentando interdigitações para o interior da epiderme, que aumentam a superfície de contato e melhora a adesão entre as duas camadas. A região mais interna é a derme reticular (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Sendo um tecido conectivo, a derme contém células, substância amorfa e fibras. A substância amorfa é constituída por polissacarídeos e proteínas que interagem para formar macromoléculas de proteoglicanas higroscópicas. As células são chamadas de fibroblastos que sintetizam colágeno, que representa 75% do peso seco e até 30% do volume da derme, e elastina. 75% é colágeno tipo I e 15% colágeno tipo III e suas propriedades mudam qualitativa e quantitativamente com o envelhecimento. As fibras de colágeno e elastina são responsáveis pela resistência mecânica da pele, conferindo a elasticidade para se deformar e resiliência para recompor sua forma sem romper-se (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011; WONG et al., 2016).

1.1.3. O fator de hidratação natural da pele

O termo fator de hidratação natural (*Natural Moisturizing Factor* - NMF) foi descrito por Jacobi, em 1959, como um conjunto de componentes solúveis em água que, se removidos, diminuiria a capacidade da pele em manter níveis adequados de hidratação (JACOBI, 1959; FOWLER, 2012).

A função do NMF é manter a hidratação adequada da pele, contribuindo para a plasticidade e protegendo a pele de danos. A hidratação também é essencial para manutenção da atividade de enzimas hidrolíticas que atuam no processo de descamação, contribuindo para otimizar a função de barreira do estrato córneo. O conteúdo de água da pele é alto na derme (70% de água) e baixo na epiderme (15-30% de água), o que isola o estrato córneo do ambiente interno do organismo, mantendo os níveis adequados de hidratação nas camadas mais inferiores da pele (VERDIER-SÉVRAIN; BONTÉ, 2007; FOWLER, 2012).

O NMF é composto principalmente, de aminoácidos livres (40%) e de derivados como ácido carboxílico da pirrolidona (*Pyrrolidone Carboxylic Acid* - PCA) e ácido urocânico, além de sais inorgânicos, açúcares, ácido láctico e uréia (FOWLER, 2012).

Os componentes do NMF são altamente eficientes em atrair água do ambiente para os corneócitos, mesmo em ambientes com umidade relativa baixa, permitindo a manutenção da hidratação mesmo em ambientes relativamente secos. Os mesmos dissolvem-se na água que absorvem, formando interações iônicas com a queratina, reduzindo as forças intermoleculares entre as fibras e aumentando a elasticidade do estrato córneo (FOWLER, 2012).

A ausência ou redução do NMF está correlacionada a doenças do estrato córneo, como dermatite atópica, psoríase, ictiose e xerose, que se manifestam como áreas ressecadas, descamação, formação de estruturas semelhantes a escamas e fissuras. Se o nível de hidratação da pele estiver abaixo do ideal, as funções enzimáticas que atuam na esfoliação natural da pele ficam comprometidas, resultando em adesão e acúmulo dos corneócitos na superfície da pele, o que resulta em uma pele ressecada, com formação de escamas e aparência esbranquiçada (VERDIER-SÉVRAIN; BONTÉ, 2007; FOWLER, 2012).

A origem do NMF foi determinada como sendo derivada de aminoácidos do estrato córneo, região onde há apenas células mortas e, presumivelmente, sem atividade enzimática tornando o estrato córneo é reconhecido como uma região biologicamente morta, porém bioquimicamente ativa. Análise da composição de aminoácidos do estrato córneo desvendou que o NMF é fruto da proteólise de filagrina, uma proteína encontrada em corneócitos recém formados, cuja função é agregar filamentos de queratina, formando microfibrilas. Esses filamentos ajudam a manter a coesão e a forma achatada dos corneócitos no estrato córneo (FOWLER, 2012).

A conversão da filagrina em NMF ocorre quando os corneócitos estão migrando para camadas mais superficiais da pele e depende da atividade de água da pele e da umidade relativa do ambiente. Em ambientes úmidos a hidrólise da filagrina ocorre em camadas mais superficiais do estrato córneo e em ambientes secos, em estratos mais profundos, de forma a prevenir o ressecamento da pele. Além disso, se a atividade de água é muito alta, a filagrina é estável, se a atividade de água é muito baixa, as enzimas hidrolíticas ficam inativas e não conseguem quebrar a filagrina (FOWLER, 2012).

Anormalidades na produção do NMF também podem ocorrer por fatores ambientais. Como já citado, um ambiente extremamente seco (umidade relativa inferior a 10%) dificulta a produção de NMF, porém outros fatores podem influir, como a exposição à radiação UV e o envelhecimento intrínseco, que acarreta diminuição da produção de filagrina e diminuição da função de barreira da pele (VERDIER-SÉVRAIN; BONTÉ, 2007; FOWLER, 2012).

1.1.4. A função protetora da pele

A pele age como barreira física, sendo a epiderme a camada responsável pela proteção contra as ações do meio ambiente. O estrato córneo é relativamente impermeável, devido a dois fatores: o arranjo dos queratinócitos, que são interligados através da proteína fibrosa queratohialina e da involucrina; e dos espaços intercelulares preenchidos por uma matriz

lipídica, que confere uma barreira robusta à prova d'água (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010). É preciso pontuar, no entanto, que algumas substâncias, em diferentes proporções e dependendo da região do corpo poderão penetrar a pele (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A pele também oferece proteção contra organismos invasores, pois apresenta mecanismos como a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), células de Langerhans residentes e células T transientes. Além disso, o ressecamento da epiderme e a constante descamação previne o crescimento sustentável de microrganismos na pele.

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são produzidos por células viáveis da epiderme responsáveis pela eliminação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e alguns vírus.

As células de Langerhans são células dendríticas que, após lesão da epiderme, sofrem transformações que lhes permite migrar da epiderme em direção aos linfonodos, atraindo células T e iniciando a resposta do sistema imune (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A radiação ultravioleta é uma energia eletromagnética que pode causar danos ao organismo, desde envelhecimento e queimaduras até câncer, por danos causados ao DNA. A pele age como camada protetora de duas maneiras: refletindo parte da radiação, o que reduz a dose de exposição e aumenta a atividade de melanócitos que produzem melanina, que absorve parte da radiação (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A hidratação adequada é um ponto crítico para manutenção de uma pele saudável. A habilidade da pele em reter água está relacionada às características do estrato córneo, que constitui a camada mais externa da pele, cuja função de barreira à perda de água associada à presença de enzimas e fatores de hidratação têm a função de manter a saúde e plasticidade da pele. Além disso, uma hidratação adequada permite que a pele tenha a plasticidade mecânica que o movimento do corpo exige. Assim a pele saudável pode contrair e esticar sem o aparecimento de cortes ou fissuras (LODEN, 2005; BONTÉ, 2011).

A perda de água transepidérmica (*Transepidermal Water Loss* - TEWL) também é influenciada pelo teor de hidratação da pele, pois a pele ressecada aumenta a perda de água e a susceptibilidade da pele à irritação pelo contato com substâncias químicas. O ressecamento do estrato córneo leva a uma diminuição de tamanho das células, prejudicando o arranjo e permitindo o aparecimento de espaços entre as células, o que diminui a proteção contra injúrias mecânicas e químicas (LODEN, 2005; BONTÉ, 2011; LORENCINI et al., 2014).

1.2. Óleos vegetais

A biodiversidade brasileira apresenta-se como uma imensurável fonte de matérias primas para as indústrias farmacêutica e cosmética. Os óleos vegetais são um grande exemplo, por apresentarem em sua composição glicerol, ésteres, vitaminas e ácidos graxos essenciais, e características associadas com compatibilidade, maior ou menor, com a pele conferindo-lhe e emoliência, oclusividade e brilho. As diferenças nas composições químicas dos óleos vegetais podem também proporcionar diferentes efeitos bioquímicos na pele, como a diminuição da perda de água, aumento da produção de matriz extracelular, aumento da descamação dos corneócitos e renovação da pele (SANTOS et al., 2011; LORENCINI et al., 2014).

A busca por novas matérias primas para o preparo de óleos vegetais vem crescendo, devido a fatores como as novas pesquisas para produção de biodiesel, o aumento nos preços de derivados de petróleo e a busca por matérias primas mais ecológicas e de menor impacto ao meio ambiente (HETTIARACHCHI et al., 2010).

Até o século XIX a maior parte dos recursos terapêuticos disponíveis eram plantas e extratos vegetais. Quando esses recursos começaram a ser estudados, foram sendo descobertos os “princípios ativos”, substâncias ativas isoladas, sendo algumas delas extraídas de plantas e outras produzidas com vantagem em laboratório (o que permite a constância de composição, facilidade de padronização, etc). Porém, mesmo com o desenvolvimento da química orgânica, alguns remédios não podem ser sintetizados em laboratório, ou porque o responsável pela ação terapêutica é um conjunto de substâncias, ou porque alguns adjuvantes presentes são importantes na administração ou manutenção da qualidade do medicamento (SIMÕES et al., 2010).

Alguns derivados de plantas, tidos como “remédios naturais” têm sido utilizados por séculos para tratar doenças de pele como psoríase e dermatites, mesmo o consenso em torno de sua eficácia sendo limitado. Muitos produtos, já utilizados por comunidades tradicionais, têm seus benefícios estudados para identificar suas propriedades farmacológicas (ABURJAI; NATSHEH, 2003; HETTIARACHCHI et al., 2010)

Os principais constituintes de um óleo vegetal são o glicerol e ácidos graxos, porém sua composição varia conforme a espécie e a parte da planta usada para extração. 95% dos ácidos graxos existentes em produtos naturais são formados pelos ácidos palmítico (C_{15} – cadeia com 15 átomos de carbono), esteárico (C_{16}), oleico (C_{17}) e linoleico (C_{18}) (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000; SIMÕES et al., 2010)

A indústria cosmética requer óleos com estabilidade à oxidação, insípido, inodoro e

sendo ainda desejável que os mesmos apresentem composição química que promova ação cutânea. (HETTIARACHCHI et al., 2010).

1.2.1. Óleo de café verde

O óleo de café verde é extraído das sementes não torradas de café arábica (*Coffea arabica* L.), que contêm em torno de 15% de lipídeos. A maior parte dos lipídeos está localizada no endosperma das sementes e apenas uma pequena parte (cera) está localizada na camada mais externa das sementes (figura 3) (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

Figura 3 - Aspecto dos grãos verdes de café (não torrados).

Fonte: (REBÊLO, 2005)

O óleo é rico em ácido linoleico e apresenta-se rico em matéria insaponificável (em torno de 13%) que lhe confere a função de absorver radiação UVB (WAGEMAKER *et al.*, 2015).

WAGEMAKER *et al* (2011) e OLIVEIRA *et al.* (2006) descreveram a composição lipídica do óleo de café, apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da fração lipídica do grão de café (*Coffea arabica*, L.).

Ácido graxo	% (m/m)
Ácido linoleico	44,0
Ácido palmítico	34,0
Ácido oleico	9,0
Ácido esteárico	7,0
Ácido aracdônico	3,0
Ácido linolênico	1,5
Ácido behênico	0,7
Ácido eicosanóico	0,3
Cera	0,2 - 0,3

Fonte: OLIVEIRA et al., 2006; WAGEMAKER et al., 2015

A fração insaponificável é rica em diterpenos, principalmente cafestol, caveol e 16-O-metilcafestol, que apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante e quimioprotetora. Além da capacidade em manter a hidratação da pele o uso cosmético do óleo de café está relacionado à proteção contra os efeitos da radiação UVB (PEREDA et al., 2009; WAGEMAKER et al., 2011).

O óleo de café verde apresentou, em estudos *in vitro* realizados em culturas de fibroblastos, estímulo à produção de componentes da matriz extracelular, bem como de fatores de crescimento TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta) e GM-CSF (Fator estimulante de colônias -granulócitos e macrófagos). Esses fatores de crescimento auxiliam na reparação da pele, regulação do crescimento e diferenciação celular. O TGF- β é essencial para ativação da produção de colágeno e elastina pelos fibroblastos e o GM-CSF é crucial na regulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos e formação de uma epiderme intacta. Além disso, o óleo de café promove aumento da expressão genética de aquaporinas, estruturas que auxiliam a manutenção da hidratação e o equilíbrio de água e glicerol na pele, melhorando a função de barreira (PEREDA et al., 2009).

1.2.2. Óleo de urucum

O óleo de urucum é extraído das sementes da espécie *Bixa orellana* L., uma árvore pequena, medindo de 3 a 5 metros de altura, em média. As sementes, que representam a parte

de interesse comercial da planta, se desenvolvem dentro de cápsulas, que contêm em média 30 a 60 sementes (figura 4) (VILAR et al., 2014).

O urucuzeiro é uma planta nativa do Brasil, cultivada também em outros países da América do Sul, utilizada por indígenas para rituais, como camuflagem e para proteção contra picadas de insetos. A planta também fornece corantes que são amplamente utilizados na indústria alimentícia, por serem de fácil obtenção e atóxico. Os corantes identificados no urucum são formados à base dos carotenoides bixina e norbixina e proporcionam cores de diferentes tonalidades que variam entre o vermelho ao amarelo (COSTA et al., 2013; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015)

Figura 4 - Aspecto do fruto e das sementes de urucum.

Fonte: (RÉ JORGE, 2009)

Os usos populares do urucum vão desde a aplicação como condimento e corante, até como medicamento, sendo reportado usos como laxante, cardiotônico, hipotensivo, expectorante e antibiótico. Na pele é utilizado para colorir o corpo em rituais, pela ação anti-inflamatória em feridas e hematomas, pela proteção à pele contra radiação ultravioleta e, ainda, como repelente de insetos (VILAR et al., 2014).

O óleo de urucum contém tocotrienol e tocoferol, compostos de vitamina E, com ação antioxidante, que previnem oxidação lipídica tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos, devido à capacidade doadora de hidrogênio (ZOU; AKOH, 2015).

A composição do óleo, descrita por (COSTA et al., 2013) está listada na tabela 2.

Tabela 2 - Composição da fração lipídica do óleo de urucum (*Bixa orellana*, L.).

Ácido graxo	% (m/m)
Ácido linoleico	19,5
Ácido palmítico	15,5
Ácido oleico	8,1
Ácido esteárico	7,1

Fonte: COSTA et al., 2013

1.3. Emulsões

Emulsões são dispersões coloidais de, ao menos, dois líquidos imiscíveis entre si. Portanto, a formação de emulsões não é espontânea, e suas propriedades dependem, não somente das características físico química e biológicas de seus componentes mas, dos métodos utilizados na preparação e da ordem de adição dos mesmos (FORGIARINI et al., 2001).

As emulsões são sistemas de destaque no campo da cosmética, sendo uma das mais antigas formas de apresentação de produtos comerciais. O físico grego Galeno (150 d.C.) é considerado o inventor da primeira emulsão, denominada *cold cream*, para tratar a pele com aspecto envelhecido que, após constatar que o aspecto era causado tanto pela perda de água quanto de gordura, teve a ideia de incorporar as duas matérias primas (CORREA; KUREBAYASHI; ISSAC, 2012).

O fundamento do processo de emulsificação consiste em dividir uma das fases do sistema contendo dois líquidos imiscíveis em pequenos glóbulos, provocando um aumento da superfície de contato entre elas. Tal aumento contraria a tensão superficial, que é a tendência de um líquido de reduzir a sua área de superfície a um mínimo de energia potencial. Assim, para que a emulsão se forme e seja estável é necessário o emprego de energia e o uso de substâncias emulsificantes, que facilitam a obtenção da emulsão e contribuem para sua estabilidade (CORREA; KUREBAYASHI; ISSAC, 2012).

A estrutura física da emulsão é composta por gotículas da fase interna, dispersa na fase externa, ou dispersante e a partir desta composição de fases, são classificadas em: óleo-em-água (O/A) quando a fase interna é oleosa e a fase externa é aquosa; e água-em-óleo (A/O), quando a fase interna é aquosa e a fase externa é oleosa (FORGIARINI et al., 2001).

Na formulação de emulsões, a proporção entre óleo e água, e entre os demais componentes bem como a composição (perfil de ácidos graxos, presença de resinas,

quantidade de matéria insaponificável) do óleo (ou óleos) utilizados são fatores que influem no produto final e devem ser escolhidos conforme o sistema final desejado pelo formulador (LODEN, 2005).

A fase oleosa da emulsão pode ser formada por material lipídico de origem vegetal, animal ou mineral, porém os óleos vegetais estão entre os ingredientes mais populares, tanto pelo apelo ao uso de produtos naturais, quanto pela multiplicidade de perfis químicos de ácidos graxos, que lhes conferem diferentes graus de estabilidade e promovem sensações e efeitos diversos na pele (LODEN, 2005).

A estabilidade de emulsões deve-se ao uso de tensoativos, substâncias anfifílicas, ou seja, substâncias que apresentam na molécula, grupamentos hidrofílicos e lipofílicos, que se posicionarão na interface entre a água e o óleo, equilibrando o sistema pela diminuição da tensão superficial. Uma das maneiras de determinar o tensoativo (ou pares de tensoativos) ideal é através do sistema Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo - EHL. Desenvolvido por Griffin, em 1949, o sistema EHL classifica os tensoativos em uma escala adimensional que varia de 1 a 20, de acordo com a sua natureza, lipofílica (valores mais baixos) ou hidrofílica (valores mais altos). Tensoativos com valores de EHL mais baixos tendem a produzir emulsões A/O, enquanto aqueles com valores e tensoativos de EHL mais alto produzirão emulsões O/A (GRIFFIN, 1949; ZANIN et al., 2002).

1.3.1. Processos de instabilidade de emulsões

Emulsões são sujeitas a processos de instabilidade dada a natureza dos componentes utilizados para sua formulação, sendo os mais comuns (figura 5):

- **cremeação ou sedimentação:** fenômenos causados pela ação da gravidade, onde os glóbulos tendem a separar-se da fase externa e emergirem (cremeação), quando sua densidade é menor que a da fase externa, ou submergirem (sedimentação), quando sua densidade é maior que a da fase externa, causando a formação de duas porções distintas, com proporções diferentes de fase interna e externa (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; TOPAN, 2012);
- **floculação:** a ação de forças de Van der Waals, causa a uma agregação dos glóbulos, com manutenção do filme interfacial e integridade individual dos glóbulos (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; TOPAN, 2012);
- **coalescência:** processo no qual os glóbulos se unem, com a ruptura do filme

interfacial, fundindo-se para formar glóbulos maiores, levando à separação de fases (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; TOPAN, 2012).

Figura 5 - Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões.

Fonte: elaborada pela autora

1.3.2. Nanoemulsões

Nanoemulsões (NEs) são sistemas cineticamente estáveis, caracterizados por apresentarem o tamanho dos glóbulos na escala nanométrica. Esta característica proporciona melhora na eficiência da penetração cutânea de ativos presentes na formulação, apresentam sensorial agradável e podem ser preparadas com uso de quantidades menores de tensoativos, se comparadas com as emulsões convencionais, diminuindo a possibilidade de ocorrência de irritação da pele (PEREIRA et al., 2016).

O tamanho dos glóbulos das nanoemulsões varia entre 20 e 500 nm, ou entre 50 a 1000 nm, dependendo da classificação utilizada pelo pesquisador, porém muitos consideram 500 nm como o limite máximo para o sistema ser considerado como nanoemulsão. O produto final pode ser transparente (permite a passagem da luz e é possível ver nitidamente através da NE) ou translúcido (permite a passagem da luz, mas não permite visualizar através da NE), apresentando-se estável em relação à sedimentação e cremeação (FORGIARINI et al., 2001;

ROCHA-FILHO et al., 2014; YUKUYAMA et al., 2015)

Os estudos de aplicações de NEs abrangem diversos campos de conhecimento, como alimentos, farmacêutico e embalagens.

NEs são estudadas como veículos para a administração de substâncias hidrofóbicas, melhorando sua biodisponibilidade e para direcionar a administração de medicamentos a tecidos específicos ou melhorar o diagnóstico de doenças, através da utilização de ligantes presos à superfície dos glóbulos e o controle do tamanho de partícula (GANTA et al., 2016).

Na busca por antibióticos mais eficazes contra microrganismos resistentes e produtores de biofilme, NEs mostraram-se eficazes na destruição do biofilme, permitindo que o antibiótico agisse diretamente no microrganismo, aumentando a eficácia do medicamento em concentrações menores (HWANG et al., 2013).

Para a indústria de alimentos, NEs podem conter vitaminas, com o objetivo de proteger da oxidação, degradação por calor e aumentar a biodisponibilidade. Além disso, quando a NE desenvolvida apresentar aspecto transparente, possibilita a aplicação em alimentos sem modificação da aparência, inclusive de bebidas (SABERI; FANG; McCLEMENTS, 2013).

No campo da cosmética, as NEs vem apresentando resultados promissores para o desenvolvimento de novos produtos com afinidade pela pele, evitando absorção pela corrente sanguínea (CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2015). Também foram observados efeitos como o aumento de hidratação e da concentração de colágeno na pele, em produtos para combater o envelhecimento da pele (NGAN et al., 2015), bem como melhor ação anti-inflamatória, quando comparada com a emulsão convencional, preparadas com o mesmo extrato vegetal (BRESOLIN et al., 2016).

A aplicação das NEs no campo da cosmética apresenta a uma série de vantagens, segundo enumera TADROS et al. (2004):

- a diminuição da força gravitacional e o movimento Browniano dos glóbulos pode evitar a ocorrência de cremação ou sedimentação durante o armazenamento;
- o tamanho das partículas também previne a ocorrência de floculação e coalescência, mantendo o sistema disperso e estável;
- nanoemulsões podem ser um veículo eficiente para facilitar a penetração de ativos através da pele, devido à grande área superficial, resultante da grande quantidade de glóbulos de tamanho diminuto;
- o pequeno tamanho dos glóbulos permite uma distribuição uniforme na pele e,

consequentemente, provável uniformidade na penetração de ativos;

- nanoemulsões podem ser utilizadas em substituição a lipossomos e vesículas, que são menos estáveis.

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de baixa ou de alta energia. Nos métodos de alta energia a força de cisalhamento aplicada à formulação promove a deformação e diminuição do tamanho dos glóbulos. Uma emulsão primária é preparada e submetida a homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou ultrassom para diminuir progressivamente o tamanho dos glóbulos. Pode-se também obter a diminuição do tamanho de partícula com um aumento na concentração de tensoativos, o que poderá causar problemas de sensibilização e irritação da pele conforme o sistema tensoativo selecionado, no caso de produtos cosméticos. Nos métodos de baixa energia, as propriedades físico-químicas do sistema são utilizadas para alterar a curvatura espontânea dos glóbulos formados pelo tensoativo. Os métodos que fazem uso da transição de fases produzida durante o processo de emulsificação podem diminuir o tamanho de partícula pela variação de temperatura ou variação da composição durante a preparação (FERNANDEZ et al., 2004; ROCHA-FILHO et al., 2014).

A ocorrência de instabilidade em nanoemulsões geralmente resulta do processo chamado *Ostwald ripening*, causado pelo transporte de material de glóbulos oleosos menores para maiores, o que causa sua condensação, seguida de separação de fases (figura 6) (TADROS, 2004; McCLEMENTS, 2007).

Figura 6 - Representação do processo de instabilidade *Ostwald ripening*.

Fonte: elaborado pela autora

1.3.2.1. Métodos de obtenção de NEs

1.3.2.1.1. Métodos de alta energia

Os métodos de alta energia utilizam equipamentos capazes de produzir uma força mecânica intensa que supere a força interfacial entre dois líquidos imiscíveis e promover a formação de glóbulos em escala nanométrica. Quando a energia supera a tensão interfacial, os glóbulos são fragmentados em glóbulos menores, aumentando a quantidade de glóbulos por volume (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2015).

Geralmente, a obtenção de nanoemulsões por métodos de alta energia compreende duas etapas: primeiro a deformação e fragmentação dos glóbulos macrométricos em glóbulos menores e segundo a adsorção de moléculas do tensoativo na interface dos novos glóbulos, garantindo a estabilização (YUKUYAMA et al., 2015).

Conforme a técnica utilizada, Yukuyama et al. (2015) categorizam os métodos de alta energia em:

- Rotor de alta taxa de cisalhamento, no qual a emulsão macrométrica é submetida a altas taxas de cisalhamento, permitindo a quebra dos glóbulos em tamanhos menores;
- Ultrasonicação, que é baseado no mecanismo de cavitação, no qual a diferença de pressão causada pelo movimento mecânico gera implosão de bolhas, cuja energia é suficiente para diminuir o tamanho dos glóbulos;
- Homogeneizador de alta pressão, método onde a emulsão é forçada a atravessar uma pequena abertura, causando a diminuição do tamanho dos glóbulos por cisalhamento, cavitação e colisão entre os glóbulos;
- Microfluidização, no qual os dois líquidos imiscíveis são bombeados sob alta pressão e forçados a atravessar um homogeneizador.

Os métodos de alta energia produzem glóbulos menores quanto maior a energia utilizada para gera-los (SOLANS; SOLÉ, 2012).

1.3.2.1.2. Métodos de baixa energia

Nos métodos de baixa energia, a formação da nanoemulsão depende menos da energia fornecida ao sistema e mais das propriedades dos tensoativos utilizados e da composição da formulação. As nanoemulsões são preparadas utilizando-se velocidades baixas de agitação, em comparação aos métodos de alta energia. Além disso, podem ser utilizados para preparo de nanoemulsões utilizando moléculas sensíveis e são mais eficientes com relação ao uso da

energia fornecida ao sistema, quando comparados aos métodos de alta energia (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2015).

A emulsificação espontânea ocorre em condições específicas, quando um solvente, miscível em água, contendo uma pequena quantidade de óleo é misturado à água, formando uma nanoemulsão pela rápida difusão do solvente (por exemplo, álcool ou acetona) da fase oleosa para a aquosa. Esse método apresenta a vantagem produzir nanoemulsões à temperatura ambiente, sem necessidade de aquecimento, e desvantagens como a limitação da quantidade de óleo utilizada e a necessidade de evaporação do solvente utilizado após a formação da nanoemulsão (YUKUYAMA et al., 2015)

Os métodos incluem a emulsificação espontânea e o método de inversão de fases (*Emulsion Phase Inversion* - EPI), que por sua vez se divide em inversão de fase por alteração da composição (*Phase Inversion Composition* – PIC) e inversão de fase por variação de temperatura (*Phase Inversion Temperature* – PIT) (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2015).

O mecanismo de formação de glóbulos das emulsões baseia-se na propriedade dos tensoativos de formar um filme na interface entre a água e o óleo que se organiza como uma esfera tendo a parte hidrofílica voltada para a fase externa e a parte hidrofóbica voltada para a fase interna, em emulsões O/A. O inverso ocorre para emulsões A/O (figura 7). Essa esfera tem uma curvatura média que é determinada pela natureza e pelo tamanho da molécula do tensoativo (ou tensoativos) utilizado. Na concentração onde não há excesso de nenhuma das fases (aquosa ou oleosa), o tensoativo forma estruturas que apresentam-se como um filme de surfactante de curvatura zero, que podem ser microemulsões bicontínuas ou cristais líquidos lamelares. Essas estruturas permitem a coexistência das fases aquosas e oleosas ao longo do filme interfacial formado pelo tensoativo (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2015).

Figura 7 - Representação da organização das moléculas do tensoativo nos glóbulos da nanoemulsão.

Fonte: elaborada pela autora

O método PIC, descrito aqui para o preparo de uma nanoemulsão O/A, consiste na sucessiva adição da água à mistura de óleo e tensoativos, causando inicialmente a formação de gotículas de água na fase oleosa. A afinidade do tensoativo pela fase oleosa aumenta até a formação de uma microemulsão estável (A/O) ou a formação de cristal líquido em fase lamelar. Com o progressivo aumento do volume de água, a curvatura espontânea do tensoativo é alterada, a microemulsão se torna instável e a curvatura do tensoativo se inverte, formando a nanoemulsão. A partir desse ponto, o aumento do volume de água não altera o tamanho dos glóbulos (FERNANDEZ et al., 2004; YUKUYAMA et al., 2015).

O método PIT é baseado na uso de um tensoativo não iônico polietoxilado, que tem como característica a mudança de afinidade à água ou ao óleo, em função da temperatura, fixando-se o valor de EHL do sistema, de acordo com o óleo utilizado. Assim, em razão da hidratação da terminação polar do tensoativo, que se torna maior que a terminação apolar, a curvatura espontânea do tensoativo favorece a formação de emulsões O/A. Com o aumento da temperatura e a desidratação da terminação polar, a terminação apolar torna-se mais volumosa, favorecendo a formação de emulsões A/O. Na temperatura intermediária o tensoativo exibe afinidade similar à água e ao óleo, ocorrendo a formação de uma microemulsão estável (A/O) ou a formação de cristal líquido em fase lamelar. Com o resfriamento rápido da emulsão a curvatura do tensoativo se inverte, os glóbulos da microemulsão são rompidos e o tensoativo se organiza em glóbulos menores, formando a nanoemulsão. É importante que a mudança de temperatura seja rápida para garantir a formação da nanoemulsão, pois se o aquecimento ou resfriamento não forem suficientemente rápidos, ocorre coalescência e a formação de emulsões polidispersas (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2015).

1.4. O sistema Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL)

O sistema EHL foi primeiramente descrito por William Griffin (1949) e ainda é utilizado para a escolha de tensoativos ou sistemas tensoativos que resultem em emulsões estáveis, considerando-se o óleo ou mistura de óleos a serem utilizados. No seu trabalho pioneiro, apresentado no *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, Griffin define que emulsificantes apresentam, em suas moléculas, grupos hidrofílicos e lipofílicos e que o equilíbrio do tamanho e da força desses grupos é chamado de EHL – Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo. O autor apresenta, ainda, relação de valores de EHL_{req} para alguns óleos e determina que, para uma mistura de tensoativos, o valor de EHL da mistura é obtido pela adição dos valores de EHL dos tensoativos individuais, multiplicada pela proporção de cada tensoativo utilizada (ORAFIDIYA e OLADIMEJI, 2002; PASQUALI et al., 2008, 2009).

De acordo com os critérios estabelecidos por Griffin, quanto maior o valor de EHL, mais hidrofílico o tensoativo. O autor também estabeleceu fórmulas matemáticas para cálculo dos valores de EHL, a partir da porcentagem dos grupos hidrofílicos presentes na molécula do tensoativo (GRIFFIN, 1949; PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008).

A escolha do tensoativo ideal para o preparo de emulsões estáveis de acordo com o sistema EHL deve considerar o tipo de emulsão desejado. Assim, se o formulador deseja preparar uma emulsão A/O deve escolher um tensoativo com valores de EHL entre 3 e 8. Do contrário, se o desejo for a formulação de emulsão O/A, o tensoativo deve ter valor de EHL entre 9 e 12 (SCHMIDTS et al., 2010).

Emulsões estáveis podem ser formuladas usando-se um ou mistura de tensoativos cujo valor de EHL é próximo do requerido pela fase oleosa. O valor de EHL requerido (EHL_{req}) é o valor que representa o tensoativo, ou mistura de tensoativos, capaz de produzir a melhor emulsão com o óleo, ou mistura de óleos, ou seja, uma emulsão sem sinais de instabilidade como floculação ou coalescência (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; MORAIS et al., 2008).

É possível encontrar na literatura valores de EHL_{req} para alguns dos óleos mais utilizados, o que facilita a escolha do sistema tensoativo a ser utilizado no preparo de emulsões A/O ou O/A (NEEDS, 1976).

PASQUALI et al. (2008) apresentam algumas considerações sobre o cálculo dos valores de EHL de um óleo ou de uma mistura de óleos, conforme descrito por Griffin. O valor de EHL requerido para uma mistura de óleos pode ser calculado empiricamente, ou matematicamente, através da equação 7.

$$EHL_{req} = \sum EHL_{req_i} \times f_i \quad (\text{Equação 7})$$

Onde f_i é a fração da massa (ou peso) do óleo i na mistura.

Quando o valor de EHL de um óleo ou mistura de óleos não forem encontrados na literatura, é possível determinar empiricamente os valores de EHL através da preparação seriada de emulsões com diferentes concentrações de misturas de tensoativos, que representem diferentes valores de EHL. A estabilidade das emulsões deve ser verificada e a emulsão (ou emulsões) mais estável representa o valor de EHL requerido para o óleo (ou mistura de óleos) utilizada (SCHMIDTS et al., 2010).

Desde sua publicação, o método EHL vem sofrendo críticas por vários pesquisadores, principalmente pela natureza arbitrária da determinação de valores proposta por Griffin. Outras metodologias foram propostas, para substituir ou determinar o valor de EHL com mais acurácia, baseados na medida da tensão superficial, na polaridade, na constante dielétrica, na separação por cromatografia gás-líquido, na temperatura de inversão de fase, entre outros. Porém o sistema EHL continua sendo confiável para otimizar o preparo de emulsões, reduzindo o número de experimentos que seriam necessários para a escolha empírica do sistema tensoativo (PASQUALI; SACCO; BREGNI, 2009)

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Formular nanoemulsão aditivada, à base de óleos de urucum e óleo de café verde e avaliar a estabilidade da formulação, bem como o potencial antioxidante e fotoprotetor.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o valor de EHL dos óleos de café verde e urucum, possibilitando o desenvolvimento de formulações com o uso dos mesmos;
- Estudo do valor de EHL requerido para obtenção de nanoemulsão utilizando a mistura de óleos de café e urucum;
- Estudo do sistema tensoativo para obtenção de nanoemulsão estável usando os óleos de café e urucum;
- Avaliação da estabilidade físico-química das formulações desenvolvidas;
- Aditivação da nanoemulsão para obtenção de produto cosmético;
- Determinação *in vitro* do potencial antioxidante das formulações preparadas;
- Determinação *in vitro* da capacidade fotoprotetora da nanoemulsão aditivada;
- Avaliação da oclusividade da emulsão;
- Avaliação do perfil de viscosidade e análise sensorial da nanoemulsão aditivada.

3. Material e métodos

3.1. Material

Todas as matérias primas utilizadas estão denominadas conforme o *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* (INCI).

3.1.1. Fase Oleosa

3.1.1.1. Óleo de Café Verde

INCI: *Coffea arábica (coffee) seed oil* - Fornecedor: Chemyunion do Brasil.

Características: Líquido oleoso, límpido a levemente turvo, marrom esverdeado a âmbar, com odor característico.

Índice de saponificação (mg KOH/g): 140 – 190

Índice de acidez (mg KOH/g) : máx. 12

Índice de peróxido (meq/kg) : máx. 15

3.1.1.2. Óleo de Urucum

INCI: *Bixa Orellana Seed Oil* - Fornecedor: Fagron

Características: Líquido viscoso, de coloração avermelhada ou alaranjada, com odor característico.

Índice de saponificação (mg KOH/g): 170 – 200

Índice de acidez (mg KOH/g): máx. 3

Índice de Peróxido (meq/Kg); máx. 10

3.1.2. Fase Aquosa

Água deionizada recém obtida.

3.1.3. Tensoativos

3.1.3.1. Hidrofílicos:

- Lanolina etoxilada com 75 OE (*solução aquosa 50%*) - valor de EHL: 16,6.

INCI: *PEG- 75 Lanolin*

Nome comercial: Solan[®] 75 - Fornecedor: Croda do Brasil S. A.

- Álcool cetó-estearílico 20 OE – valor de EHL: 15,4
INCI: *Ceteareth 20*
Nome comercial: Alkonat[®] CE 200 F - Fornecedor: Oxiteno
- Álcool estearílico 20 OE – valor de EHL: 15,3
INCI: *Steareth-20*
Nome comercial: Alkonat[®] E 200 F - Fornecedor: Oxiteno
- Álcool cetó-estearílico 5 OE – valor de EHL: 10,0
INCI: *Ceteareth 5*
Nome comercial: Alkonat[®] CE 50 - Fornecedor: Oxiteno
- Álcool cetílico 20 OE – valor de EHL: 15,4
INCI: *Ceteth 20*
Nome comercial: Alkonat[®] C 200 - Fornecedor: Oxiteno
- Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano – valor de EHL: 15,0
INCI: *Polysorbate 80*
Nome comercial: Tween[®] 80 - Fornecedor: Oxiteno
- Monoestearato de sorbitano – valor de EHL: 14,9
INCI: *Polysorbate 60*
Nome comercial: Tween[®] 60 – Fornecedor: Oxiteno
- Monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE – valor de EHL =16,7
INCI: *Polysorbate 20*
Nome comercial: Tween[®] 20 - Fornecedor: Oxiteno
- Óleo de Rícino 30 OE – valor de EHL: 11,7
INCI: *PEG-30 Castor oil*
Nome comercial: Alkest[®] CSO R 300- Fornecedor: Oxiteno
- Óleo de Rícino 36 OE- valor de EHL: 12,6
INCI: *PEG-36 Castor oil*
Nome comercial: Alkest[®] CSO R 36 - Fornecedor: Oxiteno
- Óleo de Rícino hidrogenado 40 OE - EHL: 13,0
INCI: *PEG-40 hydrogenated Castor oil*
Nome comercial Alkest[®] CSO RH 400 - Fornecedor: Oxiteno
- Óleo de Rícino 54 OE – valor de EHL: 14,4
INCI: *PEG-54 Castor oil*
Nome comercial: Alkest[®] CSO R 540 -Fornecedor: Oxiteno

3.1.3.2. Lipofílicos

- Álcool laurílico 2 OE – valor de EHL: 6,2
INCI: *PEG lauryl alcohol*
Fornecedor: Cognis do Brasil
- Álcool estearílico 2 OE – valor de EHL: 4,9
INCI: *Steareth-2*
Fornecedor: Beraca
- Álcool cetílico 2 OE – valor de EHL: 5,3
INCI: *Ceteth 2*
Nome comercial: Alkonat[®] C 20 - Fornecedor: Oxiteno
- Óleo de rícino 15 OE – valor de EHL: 8,3
INCI: *PEG-15 Castor oil*
Nome comercial: Alkest[®] CSO R 150- Fornecedor: Oxiteno
- Monooleato de sorbitano - EHL: valor de 4,3
INCI: *Sorbitan Monooleate*
Nome comercial: Span[®] 80 - Fornecedor: Lipo do Brasil
- Monoestearato de sorbitano – valor de EHL: 4,7
INCI: *Sorbitan monoestearate*
Nome comercial: Span[®] 60 – Fornecedor: Lipo do Brasil
- Monolaurato de sorbitano – valor de EHL: 8,6
INCI: *Sorbitan Monolaurate*
Nome comercial: Span[®]20 - Fornecedor: Lipo do Brasil
- Óleo de rícino 15 OE – valor de EHL: 8,3
INCI: *PEG-15 Castor oil*
Nome comercial: Alkest[®] CSO R 15- Fornecedor: Oxiteno

3.1.4. Modificador reológico:

OptaSense[™] RMA-IS

INCI: *Sodium Polyacrylate (and) Caprylic/Capric Triglyceride (and) Paraffinum Liquidum (and) Tri(PPG-3 Myristyl Ether) Citrate (and) Sorbitan Laurate (and) Trideceth-6*

Fornecedor: Croda do Brasil S. A.

3.1.5. Ativos

3.1.5.1. Hidratante

Rarofucose[®]

INCI: *Biosaccharide gum-1*

Fornecedor: Mapric

3.1.5.2. Ativo “retinóide-like”

Revinage[®]

INCI: *Bidens Pilosa Extract (and) Elaeis Guineensis (Palm) Oil (and) Gossypium Herbaceum (Cotton) Seed Oil (and) Linum Usitatissimum (Linseed) Seed*

Fornecedor: Chemyunion

3.1.6. Filtro solar físico

Dióxido de titânio - INCI: *Titanium Dioxide*

Fornecedor: Merck

3.1.7. Conservante microbiológico

INCI: *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*

Nome comercial: Phenova[®] - Fornecedor: Croda do Brasil S. A.

Características: Preservante microbiológico de amplo espectro, líquido à temperatura ambiente, não afeta a cor e odor dos produtos finais.

3.1.8. Equipamentos

- balança analítica Denver Instruments Company, modelo A-250 com precisão de 4 casas (Arvada, CO, EUA);
- balança eletrônica Marte, modelo A-2000, com precisão de 2 casas (Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil);
- agitador IKA RW 20 (Staufen, Baden-Württemberg, Alemanha);
- banho termostatzado Nova Técnica[®], modelo 281-NT (Piracicaba, SP, Brasil)
- centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R (Guarulhos, SP, Brasil);
- sistema purificador de água, osmose reversa OS 10LX, GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil);
- microscópio Olympus, modelo BX 50;
- peagômetro PG 1800 Gehaka (São Paulo, SP, Brasil);

- condutivímetro Digimed, DM-32 (Campo Grande, MS, Brasil);
- refrigerador Electrolux, modelo RDE-37 (Curitiba, PR, Brasil);
- estufa Fanem Ltda, modelo 002-CB (Guarulhos, SP, Brasil);
- *Dynamic Light Scattering Analyser* Malvern, modelo Zeta sizer Nano ZS 90 (Malvern, UK);
- viscosímetro digital Brookfield, modelo DV-I+ (Middleboro, MA, EUA);
- espectrofotômetro Hitachi[®], modelo U2001 e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Tokyo, Japão)
- Optometrics[®] SPF 290S Analyzer System, para análise de FPS (Fator de Proteção Solar) *in vitro* (Ayer, MA, EUA).

3.2. Métodos

Todos os procedimentos aqui descritos, exceto quando citado outro local, foram realizados em parceria e colaboração dos laboratórios do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP.

3.2.1. Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão (tabela 3) foi preparada pelo método de EPI – *Emulsion Phase Inversion*, no qual os tensoativos são solubilizados na fase oleosa e a mistura é aquecida à temperatura de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$. A fase aquosa, aquecida à mesma temperatura, é vertida sobre a fase oleosa, lentamente e sob agitação constante, a 600 rpm e com hélice de 4 pás, até o resfriamento da emulsão à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e, por fim, adiciona-se o conservante microbiológico (PEREIRA, 2011; SANTOS et al., 2011).

Tabela 3 - Composição da nanoemulsão.

Matéria prima	% (m/m)
Óleo de café	3,3
Óleo de urucum	1,7
<i>Ceteareth 20</i>	2,8
<i>Ceteareth 5</i>	2,2
Água purificada	90,0

3.2.2. Determinação do valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo) requerido

Para determinação do EHL requerido ($\text{EHL}_{\text{req.}}$) dos óleos, foram preparadas emulsões, conforme procedimento do item 3.2.1., variando-se a composição dos tensoativos polisorbato 80 e monooleato de sorbitano, com o objetivo de obter emulsões com valores variáveis de EHL.

A concentração necessária de cada tensoativo foi calculada utilizando-se as equações 1 e 2.

$$EHL_{req} = EHL_A \times A + EHL_B \times B \quad (\text{Equação 1})$$

$$A + B = 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: A= Tensoativo hidrofílico

B = Tensoativo lipofílico

Com base nos valores de EHL determinados para cada óleo, o procedimento foi repetido para determinar o valor de EHL para a mistura dos óleos de café e urucum, nas proporções apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Proporção dos óleos de café e urucum utilizadas para a determinação dos valores de EHL.

Proporção	Óleo de café (% m/m)	Óleo de Urucum (% m/m)
1C/2U	33,33	66,67
2C/1U	66,67	33,33
1C/1U	50,0	50,0

Legenda: C: óleo de café; U: óleo de urucum

3.2.3. Determinação do sistema tensoativo

Para a escolha de sistema tensoativo que estabilize a dispersão constituída de óleo de urucum, óleo de café e água, foram testados diversos pares de tensoativos lipofílicos e hidrofílicos (item 3.1.3), com diferentes cadeias carbônicas e diferentes graus de etoxilação no valor do EHL_{req} . A quantidade de cada tensoativo foi calculada conforme o valor do EHL destes óleos, previamente determinado por meio do método descrito em 3.2.2.

3.2.4. Influência da ordem de adição no processo de obtenção das emulsões

Para testar a influência da ordem de adição dos componentes foram preparadas emulsões, de acordo com o procedimento descrito abaixo. Todos estes métodos são sugeridos por FORGIARINI et al. (2001):

Método 1: todos os componentes da emulsão (óleos, tensoativos e água) foram pesados no mesmo béquer e aquecidos até atingir a temperatura de $75 \pm 2^\circ\text{C}$, após procede-se à agitação com agitador mecânico a 600 rpm, sendo mantida até a temperatura ambiente

($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (figura 8).

Figura 8 - Representação do método 1 de preparo da emulsão.

Fonte: elaborado pela autora

Método 2: todos os componentes da emulsão (óleos, tensoativos e água) foram pesados no mesmo béquer. À temperatura ambiente, sem aquecimento, procede-se à agitação a 600 rpm, mantida por 15 minutos (figura 9).

Figura 9 - Representação do método 2 de preparo da emulsão.

Fonte: elaborado pela autora

Método 3: em um béquer foram pesados a água e o tensoativo hidrofílico e em outro béquer, a fase oleosa e o tensoativo lipofílico. Após aquecimento à temperatura de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, submete-se a fase oleosa à agitação a 600 rpm e verte-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação, até a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) (figura 10).

Figura 10 - Representação do método 3 de preparo da emulsão.

Fonte: elaborado pela autora

Método 4: em um béquer foram pesados a água e os tensoativos hidrofílico e lipofílico em outro béquer, fase oleosa. Após aquecimento à temperatura de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, submete-se a fase oleosa à agitação com agitador mecânico, a 600 rpm e verte-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação, até a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) (figura 11).

Figura 11 - Representação do método 4 de preparo da emulsão.

Fonte: elaborado pela autora

Método 5: em um béquer foi pesada a água e em outro béquer a fase oleosa e os tensoativos hidrofílico e lipofílico. Após aquecimento à temperatura de $75 \pm 2^\circ\text{C}$, submete-se a fase oleosa à agitação com agitador mecânico, a 600 rpm e verte-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação, até a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (figura 12).

As dispersões obtidas pelos diferentes métodos propostos foram avaliadas macroscopicamente após 24 horas de preparação.

Figura 12 - Representação do método 5 de preparo da emulsão.

Fonte: elaborado pela autora

3.2.5. Influência da velocidade de agitação na estabilidade e no tamanho de partícula

Foram preparadas nanoemulsões conforme a metodologia descrita no item 3.2.1. porém, variando-se a velocidade de agitação em 600, 900 e 1200 rpm, a fim de determinar a influência da mesma na estabilidade e no tamanho de partícula da nanoemulsão.

3.2.6. Determinação do tipo de emulsão: teste de diluição

Para determinar se a emulsão obtida é óleo em água (O/A), 3g da emulsão a ser testada foram adicionadas a 7g de água purificada em um tubo de ensaio sendo homogeneizados no agitador de tubo, tipo vortex, por dois minutos e seu aspecto final foi avaliado (PRISTA, L. N.; ALVES AC; MORGADO, R, 1996).

3.2.7. Preparo da nanoemulsão aditivada

Na primeira etapa prepara-se a nanoemulsão adicionando-se à fase oleosa da mesma o ativo “retinóide-like” e procedendo o preparo conforme item 3.2.1.

Na segunda etapa procede-se à preparação em béquer separado da mistura do ativo hidratante, o modificador reológico, o filtro solar físico e o conservante microbiano. A mistura foi agitada a frio, para hidratação do modificador reológico.

Finalmente a nanoemulsão preparada na primeira etapa foi vertida sobre a mistura obtida na segunda etapa e submetida à agitação a 600 rpm, à temperatura ambiente, até a obtenção da nanoemulsão aditivada.

A formulação escolhida para o estudo foi a preparada com 30% de modificador reológico para 70% de nanoemulsão, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 - Composição da nanoemulsão aditivada.

Matéria prima	% (m/m)
Óleo de café	3,3
Óleo de urucum	1,7
<i>Ceteareth 20</i>	2,8
<i>Ceteareth 5</i>	2,2
Ativo “retinóide-like”	1,0
Modificador reológico	1,0
Ativo hidratante	1,0
<i>Titanium dioxide</i>	1,0
Conservante microbiano	0,5
Água purificada	85,5

3.2.8. Teste de estabilidade

3.2.8.1. Testes preliminares de estabilidade

A avaliação da estabilidade preliminar contribui para o desenvolvimento das formulações e seu aperfeiçoamento, além de auxiliar na produção de informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (ANVISA, 2004).

Os testes de estabilidade preliminar devem ser realizados na fase inicial de desenvolvimento do produto e tem como objetivo acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características do produto (ANVISA, 2004).

Para avaliação preliminar as formulações foram submetidas a testes de avaliação macroscópica e centrifugação. As formulações selecionadas para continuidade dos estudos foram avaliadas quanto ao tamanho dos glóbulos, índice de polidispersividade, pH, condutividade elétrica, e submetidas aos testes de estresse térmico e ciclo gela-degela.

3.2.8.1.1. Avaliação macroscópica e centrifugação

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis após 24 horas da preparação (figura 13) foram submetidas à centrifugação, à velocidade de 3.000 rpm por 30 minutos sendo avaliadas após para identificar a ocorrência de instabilidade como cremação, floculação e coalescência (MARUNO, 2009).

Para a finalidade deste estudo foram consideradas macroscopicamente estáveis, antes da centrifugação, as emulsões que não apresentaram separação visível de fases ou sinais de cremação

Figura 13 - Exemplos de emulsões consideradas instável (1), evidenciando a cremação, e estável (2).

Fonte: foto pela autora

3.2.8.1.2. Determinação do tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade

O tamanho dos glóbulos e o índice de polidispersividade das emulsões foram determinados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no ângulo de 90° , por *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Nanosizer Malvern[®] ZS). As amostras foram diluídas em água purificada na proporção de 1:100 (triplicata) (GUMIERO, 2011)

3.2.8.1.3. Determinação do valor do pH

O valor do pH das emulsões foi mensurado utilizando-se peagômetro (PG 1800 Gehaka), calibrado com as soluções tampão padrões. A medição foi feita a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as amostras foram diluídas na proporção de uma parte de emulsão para 9 partes de água (triplicata) (ANVISA, 2004).

3.2.8.1.4. Determinação da condutividade elétrica

O condutivímetro (DIGIMED[®], modelo CD-40) foi calibrado com solução padrão de KCl 0,1 N. A medida da condutividade elétrica das emulsões foi realizada à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, adicionando o eletrodo diretamente na amostra (triplicata) (MORAIS, 2006).

3.2.8.1.5. Estresse térmico

As emulsões foram submetidas a aquecimento em banho termostatzado (NOVA TÉCNICA[®], modelo 281 NT), na faixa de temperatura de 50 a 80°C , sendo o aumento da temperatura realizado de 5 em 5°C , mantendo-se em cada valor de temperatura por 30 minutos (triplicata) (BRACONI et al., 1995). Após, as emulsões foram analisadas macroscopicamente quanto à ocorrência separação de fases à cada mudança de temperatura.

3.2.8.1.6. Ciclo gela-degela

As emulsões foram armazenadas em condições de temperaturas alternadas: a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h seguindo a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h, completando assim um ciclo. No total foram 6 ciclos, totalizando 12 dias (ANVISA, 2004).

As amostras foram analisadas quanto a parâmetros físico-químicos (aspecto, valor de pH, condutividade, tamanho de partícula e índice de polidispersividade) antes do início dos ciclos e após completar o 6º ciclo.

3.2.9. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos óleos por DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi feita através da atividade sequestradora do radical DPPH• (2,2 difenil-1-picril-hidrazila).

Para avaliar o solvente mais adequado para solubilização dos óleos foram feitos testes com álcool etílico, álcool metílico e acetato de etila, em diferentes concentrações. O único solvente capaz de solubilizar homoganeamente os óleos foi o acetato de etila, sendo o

solvente escolhido para a avaliação da capacidade antioxidante.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 ml de acetato de etila, 50 µL do óleo a ser testado e 500 µl de solução alcoólica de DPPH (250 µM). Preparou-se também uma solução controle, sem a amostra do óleo. Após 30 minutos em repouso, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a $\lambda = 517$ nm. A atividade antioxidante foi então calculada, usando-se a equação 3:

$$\% \text{ sequestro} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) \times 100}{Abs_{controle}} \quad (\text{Equação 3})$$

Os testes foram feitos em triplicatas. Os valores da concentração necessária para atingir a IC₅₀ – concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• em solução – foram calculados por meio de plotação em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra de óleo e, a ordenada, a média da porcentagem da atividade antioxidante das amostras (PEREIRA, 2011; PREVC et al., 2013).

3.2.10. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante da nanoemulsão aditivada por DPPH

A avaliação da atividade do produto final foi realizada seguindo os mesmos princípios descritos no item 3.2.9., para avaliação da atividade dos óleos, porém, usando água purificada como solvente, considerando que o produto final é descrito como uma emulsão O/A.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 ml de tampão acetato de sódio, 50 µL do produto a ser testado e 500 µL de solução alcoólica de DPPH (250 µM). Preparou-se também uma solução controle, sem a amostra do produto. Após 15 minutos em repouso, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a $\lambda = 517$ nm. A atividade antioxidante foi então calculada, usando-se a equação 3.

Os testes foram feitos em triplicatas. Os valores da concentração necessária para atingir a IC₅₀ – concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• em solução – foram calculados por meio de plotação em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra de óleo e, a ordenada, a média da porcentagem da atividade antioxidante das amostras (PEREIRA, 2011; PREVC et al., 2013).

3.2.11. Avaliação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

A avaliação foi realizada através do equipamento SPF-290S Analyzer System da Optometrics®.

Uma alíquota de 110 mg foi colocada sobre uma fita Transpore® e espalhada homogeneamente sobre a superfície (70,7 x 70,7 mm), para obtenção de um filme de 2 µg/cm².

A amostra foi exposta a uma lâmpada de arco de xenônio, e o equipamento realizou análise em 12 locais diferentes da amostra, medindo a transmitância a cada 2 nm, nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm. Os valores de FPS e a razão UVA/UVB são fornecidos pelo equipamento ao final da análise.

A avaliação foi realizada no Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araraquara.

3.2.12. Avaliação da oclusividade da emulsão

A oclusividade da emulsão foi avaliada em células de gelatina, conforme metodologia descrita por ROCHA-FILHO (1997).

As células consistem em cilindros de vidro que são imersos (1cm) em uma solução de gelatina (12% m/m) que, ao solidificar, selam uma extremidade do cilindro. A outra extremidade é fechada com uma tampa, contendo 1 ml de água purificada, garantindo 100% de umidade relativa dentro da célula.

As células foram colocadas em dessecador contendo sílica como material dessecante, à temperatura ambiente (25±2°C), por 30 minutos, para equilíbrio da difusão de água. Após esse período, foram pesadas aos 25 e 50 minutos antes da aplicação da emulsão.

Após esse período, a emulsão foi uniformemente aplicada à superfície da gelatina (±300 mg/cm²) e a perda de água foi mensurada após 25, 50, 100 e 150 minutos e calculada conforme a equação 4.

$$WL(mg/cm^2) = \frac{P_{t0} - P_{tx}}{7} \times 1.000 \quad (\text{Equação 4})$$

onde: WL = Water Loss (Perda de Água); P_{t0} = Peso inicial da célula de gelatina (g); P_{tx} = Peso da célula após x minutos; denominador (7) = superfície da gelatina (cm²).

A oclusividade é calculada através da taxa de desidratação obtida antes e após a aplicação da emulsão e é calculada através da equação 5.

$$E(\%) = \frac{a_t - a_p}{a_t} \times 100 \quad E(\%) = \frac{a_t - a_p}{a_t} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde: a_t = tangente antes da aplicação da emulsão sobre a gelatina; a_p = tangente após a aplicação da emulsão sobre a gelatina.

3.2.13. Avaliação do perfil de viscosidade dinâmica da nanoemulsão aditivada

A viscosidade de uma emulsão é definida pela razão entre a tensão e a taxa de cisalhamento, conforme demonstrado na equação 6.

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde η é a viscosidade, τ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento. No caso de fluidos Newtonianos a viscosidade é um valor constante, porém para fluidos não-Newtonianos a viscosidade é função da taxa de cisalhamento (HUANG; PETERMANN, 2015).

A análise foi realizada com viscosímetro rotacional Brookfield modelo DV-I+, utilizando spindle cilíndrico S-04.

As velocidades utilizadas no teste foram de 0,3 a 100 rpm, mantendo-se a rotação por 2 minutos e depois de 100 a 0,3 rpm, com o mesmo intervalo.

3.2.14. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por meio dos testes de análise descritiva, teste triangular e estudo da intenção de compra.

A análise sensorial descritiva tem como objetivo individualizar as propriedades sensoriais do produto, através de características claramente definidas e baseadas em propriedades físicas. Um grupo de painelistas treinados compara o produto a ser avaliado com padrões já conhecidos, a fim de descrevê-lo, utilizando nomenclatura pré-definida.

A análise está dividida em quatro situações:

- Aparência, que descreve propriedades visuais do produto antes da aplicação: cor, brilho e opacidade;
- Escoamento, sobre as propriedades do produto na mão, antes da aplicação: formação de elevação, fluidez e pegajosidade pré aplicação;
- Espalhamento, propriedades do produto durante a aplicação: espalhabilidade, refrescância, sensação ao toque;

- Resíduos, avaliação do resíduo do produto em efeitos visuais, sensoriais e cinéticos: resíduo aquoso, resíduo oleoso e pegajosidade pós aplicação.

A análise foi realizada com painel treinado (14 integrantes) e comparou a nanoemulsão, a nanoemulsão aditivada, a um produto comercial (anexo I), de modo a descrever as características de cada um.

O teste triangular visa avaliar se o produto a ser testado pode ser reconhecido pelo painel como diferente de um padrão. Três amostras foram apresentadas e o painalista deveria apontar se a amostra correspondia ao mesmo produto ou era diferente do padrão apresentado.

O estudo da intenção de compra visa averiguar o comportamento do consumidor, após apresentadas as opções pela nanoemulsão aditivada e pelo produto comercial.

As análises foram realizadas com painel treinado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP, que já conhecia os padrões e a nomenclatura utilizada para os testes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão foi preparada pelo método de baixa energia descrito no item 3.2.1., que recorre à transição de fases do sistema durante o processo de emulsificação, resultando na mudança de curvatura do tensoativo. Na técnica utilizada, o tipo de emulsão é alterado com a adição da água purificada à mistura de fase oleosa e tensoativos. Assim, forma-se uma emulsão água em óleo no início do preparo, pois a quantidade de óleo é superior à quantidade de água. À medida que aumenta-se a concentração de água no sistema, altera-se a característica da fase externa do sistema e, quando o volume de água é muito superior ao de óleo, ocorre alteração da curvatura do tensoativo e tipo de emulsão originando a formação de glóbulos de tamanho nanométrico (SOLE et al., 2006).

A nanoemulsão resultante apresentou aspecto leitoso e cor amarelada, devido, principalmente, ao óleo de urucum e apresenta aroma característico do óleo de café.

4.2. Determinação do valor de EHL requerido dos óleos de café, urucum e da mistura dos óleos

Para verificar os valores teóricos de EHL da mistura de óleos, fez-se necessária a determinação dos valores de EHL dos óleos separadamente e, aplicando a equação 7, foi possível verificar a relação entre os valores de EHL teóricos e obtidos através do preparo das emulsões.

Para determinação do EHL dos óleos foram preparadas emulsões (item 3.2.1.) e a análise foi feita conforme metodologia de avaliação macroscópica descrita no item 3.2.8.1.1.

Os pares de tensoativos utilizados na preparação de emulsões para avaliação dos valores de EHL dos óleos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Pares de tensoativos utilizados na determinação dos valores de EHL dos óleos de café e urucum.

Valor de EHL	Pares de tensoativos
4,3	<i>Sorbitan monooleate</i>
5,0	A
6,0	A
7,0	A
8,0	A
9,0	A
10,0	A, C
11,0	A, B, C
12,0	A, B, C
13,0	A, B, C
14,0	A, B, C
15,0	A, B

Legenda: A = *Polysorbate 80/Sorbitan Monooleate*; B = *Polysorbate 60/Sorbitan monoestearate*;
C = *Polysorbate 20/ Sorbitan Monolaurate*.

4.2.1. Emulsões preparadas com óleo de café

As emulsões preparadas com óleo de café com valores de EHL entre 4,3 e 10,0 apresentaram-se macroscopicamente instáveis, com cremeação intensa e separação de fases, mesmo antes da centrifugação. As emulsões mais estáveis foram aquelas preparadas com valores de EHL entre 13,0 e 15,0 e os resultados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação macroscópica das emulsões preparadas com 5,0 % de óleo de café, com os pares de tensoativos utilizados.

Pares de tensoativos	Valor de EHL				
	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0
A	M	LM	M	M	-
B	IM	IM	LM	LM	LM
C	IM	IM	IM	M	-

Legenda: E= Normal; LM= levemente modificada; M=modificada; IM= intensamente modificada;

- = não testado, A = *Polysorbate 80/Sorbitan Monooleate*; B = *Polysorbate 60/Sorbitan monoestearate*;

C = *Polysorbate 60/Sorbitan monoestearate*.

Os pares de tensoativos utilizados não possibilitaram a formação de uma emulsão estável com óleo de café, para tanto seria necessário o estudo de outros pares de tensoativos, para tentar estabilizar a emulsão. Assim, o possível valor de EHL para o óleo de café, determinado neste estudo, situa-se entre 13,0 e 15,0.

4.2.2. Emulsões preparadas com óleo de urucum

As emulsões preparadas com óleo de urucum com valores EHL de 4,3 a 9,0 e de 14,0 a 15,0 mostraram-se instáveis na análise macroscópica após 24 horas, com cremação intensa e separação de fases no tubo, mesmo antes da centrifugação. As emulsões mais estáveis macroscopicamente apresentaram valores de EHL entre 10,0 e 13,0. Os resultados das análises estão apresentados na tabela 8. A análise das emulsões foi feita conforme metodologia de avaliação macroscópica descrita no item 3.2.8.1.1.

Tabela 8 - Avaliação macroscópica das emulsões preparadas com 5,0 % de óleo de urucum, com os pares de tensoativos utilizados.

Pares de Tensoativos	Valor de EHL			
	10,0	11,0	12,0	13,0
A	IM	LM	M	M
B	-	IM	IM	IM
C	IM	IM	M	LM

Legenda: E= Normal; LM= levemente modificada; M=modificada; IM= intensamente modificada; - = não

testado, A = *Polysorbate 80/Sorbitan Monooleate*; B = *Polysorbate 60/Sorbitan monoestearate*;

C = *Polysorbate 60/Sorbitan monoestearate*.

4.2.3. Emulsões preparadas com a mistura de óleos de café e urucum

Os valores de EHL para as emulsões preparadas com a mistura dos óleos de café e urucum podem ser calculados pela equação 6, considerando as proporções utilizadas e os valores médios de EHL para os óleos, determinados de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2. Assim, os valores de EHL esperados para a mistura dos óleos seriam:

- Proporção 1C:1U (1 parte de óleo de café para 1 parte de óleo de urucum) – $EHL_{req} = 13,0$
- Proporção 1C:2U (1 parte de óleo de café para 2 partes de óleo de urucum) - $EHL_{req} = 12,66$
- Proporção 2C:1U (2 partes de óleo de café para 1 parte de óleo de urucum) - $EHL_{req} = 13,33$

Para verificar os valores acima, foram preparadas emulsões com óleo de café e urucum nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, mantendo-se a concentração total de óleos em 5,0%. As emulsões foram preparadas nas faixas de valores de EHL 10,0 a 14,0 considerando o resultado dos testes descritos nos itens 4.2.1. e 4.2.2. e utilizando-se o par de tensoativos *Polysorbate 80/ Sorbitan Monooleate*

As emulsões mais estáveis foram:

- Valor de EHL 13,0 para a proporção 1C:1U,
- Valor de EHL 14,0 para a proporção 1C:2U,
- Valor de EHL 13,0 para a proporção 2C:1U.

As demais emulsões preparadas apresentaram-se intensamente modificadas após a centrifugação.

Os resultados de valores de EHL para a mistura de óleos mostrou valores próximos dos valores calculados pela equação 6, para as proporções 1C:1U e 2C:1U enquanto para a proporção 1C:2U o valor de EHL calculado pela equação 6 não resultou em emulsão estável.

O uso das equações propostas por Griffin nem sempre teve corroboração da teoria ou experimentos e a ausência de definições rigorosas ou explicações de como as fórmulas foram deduzidas motivou estudos de outros pesquisadores e até críticas ao modelo apresentado (PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008).

Considerando a ausência de embasamento teórico proposta para a dedução da equação 6, os resultados obtidos podem ser considerados apenas como uma aproximação. Assim, os valores de EHL das misturas de óleos devem ser obtidos experimentalmente, mesmo quando os valores de EHL dos óleos estão descritos na literatura, como foi feito neste estudo (PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008).

4.3. Determinação do sistema tensoativo

Geralmente, misturas de tensoativos formam sistemas mais estáveis do que a utilização de tensoativos isolados, provavelmente pela formação de um complexo na interface, resultando em uma película estabilizadora rígida (FLORENCE, A. T., 2003).

Baseando-se nessa premissa e nos resultados das avaliações demonstradas no item 4.2.3., foram preparadas emulsões com novos pares de tensoativos, apresentados na tabela 9, buscando-se a produção de nanoemulsões estáveis, dentro da faixa encontrada de valor de EHL para cada proporção da mistura de óleos.

As emulsões foram preparadas segundo a metodologia descrita no item 3.2.1. e a análise das mesmas foram feitas conforme metodologia de avaliação macroscópica descrita no item 3.2.8.1.1. Os valores de EHL utilizados na preparação de emulsões nesta fase baseiam-se nos resultados obtidos na determinação dos valores de EHL (item 4.2.3.).

Tabela 9 - Pares utilizados na determinação do sistema tensoativo.

Par de tensoativo	Hidrofilico	Lipofílico
A	<i>Polysorbate 80</i>	<i>Sorbitan monooleate</i>
B	<i>Polysorbate 60</i>	<i>Sorbitan monoestearate</i>
C	<i>Polysorbate 20</i>	<i>Sorbitan monolaurate</i>
D	<i>Ceteareth 20</i>	<i>Steareth 2</i>
E	<i>Steareth 20</i>	<i>Ceteth 2</i>
F	<i>Oleth 20</i>	<i>Oleth 3</i>
G	<i>PEG-54 Castor oil</i>	<i>Sorbitan monooleate</i>
H	<i>PEG-54 Castor oil</i>	<i>PEG-15 Castor oil</i>
I	<i>Steareth 20</i>	<i>Steareth 2</i>
J	<i>Ceteareth 20</i>	<i>Ceteareth 5</i>
K	<i>Ceteth 20</i>	<i>Ceteth 2</i>
L	<i>PEG-40 hydrogenated Castor oil</i>	<i>PEG-15 Castor oil</i>
M	<i>PEG-40 hydrogenated Castor oil</i>	<i>Sorbitan Monooleate</i>
N	<i>Steareth 21</i>	<i>Steareth 2</i>
O	<i>Steareth 21</i>	<i>Ceteareth 5</i>

Foram preparadas emulsões com a mistura dos óleos de café e urucum nas proporções apresentadas na tabela 10 e valores de EHL listados abaixo., para obtenção do(s) par(es) de tensoativos capaz(es) de estabilizar a emulsão:

- Valor de EHL 13,0 para a proporção 1C:1U,
- Valor de EHL 14,0 para a proporção 1C:2U,
- Valor de EHL 13,0 para a proporção 2C:1U.

Tabela 10 - Proporções dos óleos de café e urucum utilizadas nas emulsões preparadas para determinação do valor de EHL_{req} .

Proporção	Óleo de café (% m/m)	Óleo de urucum (% m/m)
1C/2U	33,33%	66,67%
2C/1U	66,67%	33,33%
1C/1U	50,0%	50,0%

As emulsões preparadas com a mistura dos óleos foram avaliadas conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1.1. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

As três proporções da mistura oleosa originaram emulsões estáveis porém nem todos os pares de tensoativos testados foram capazes de estabilizar todas as formulações testadas.

Além da quantidade, a natureza do tensoativo pode influenciar na formação e respectivo tamanho dos glóbulos. A combinação de tensoativos pode proporcionar a formação de glóbulos menores e consequentemente, uma emulsão mais estável, dependendo do tamanho da molécula dos tensoativos e da interação física e química para formação do glóbulo. Geralmente o tamanho do glóbulo decresce com o aumento da concentração de tensoativo, porém cada par apresenta uma concentração máxima, além da qual não é possível a diminuição dos mesmos devido ao empacotamento dos tensoativos na gotícula de óleo.

Tabela 11 - Análise macroscópica das emulsões preparadas com a mistura dos óleos de café e urucum, com os pares de tensoativos utilizados.

Emulsão	Pares de tensoativos	Valor de EHL			
		11,0	12,0	13,0	14,0
1C/2U	A	IM	IM	IM	E
2C/1U	A	IM	IM	LM	IM
1C/1U	A	IM	LM	LM	IM
1C/2U	D	-	-	IM	LM
2C/1U	D	E	E	LM	-
1C/1U	D	-	E	IM	LM
1C/2U	H	-	-	-	IM
2C/1U	H	LM	IM	IM	-
1C/1U	H	-	IM	IM	IM
1C/2U	G	-	-	-	-
2C/1U	G	LM	M	IM	-
1C/1U	G	-	M	IM	IM
1C/2U	J	-	-	IM	IM
2C/1U	J	E	E	E	-
1C/1U	J	-	E	IM	LM
1C/2U	N	-	-	IM	IM
2C/1U	N	E	E	IM	-
1C/1U	N	-	IM	IM	LM
1C/2U	O	-	-	LM	LM
2C/1U	O	E	E	IM	-
1C/1U	O	IM	LM	LM	-

Legenda: E= Normal; LM= levemente modificada; M=modificada; IM= intensamente modificada; - = não testado; A = Polysorbate 80/ Sorbitan monooleate; D = Cetareth 20/Steareth 2; G = PEG-54 Castor oil/ Sorbitan monooleate; H = PEG-54 Castor oil/PEG-15 Castor oil; J = Cetareth 20/Cetareth 5; N = Steareth 21/Steareth 2; O = Steareth 21/Cetareth 5.

Como demonstrado na tabela 11, as emulsões estáveis foram:

- 1C/2U: par A, valor de EHL 14,0;
- 2C/1U: par D, valores de EHL 11,0 e 12,0; par J, EHL 11,0, 12,0 e 13,0; par N, EHL 11,0 e 12,0; par O, EHL 11,0 e 12,0;
- 1C/1U: par D, valor de EHL 12,0; par J, valor de EHL 12,0.

A proporção de 2C/1U foi a que resultou num maior número de emulsões estáveis e numa faixa de valor de EHL mais ampla. O par de tensoativos J (*Ceteareth 20/Ceteareth 5*) foi o que originou emulsões macroscopicamente estáveis, também em faixa mais ampla de valor de EHL.

Para verificar se as emulsões obtidas tinham glóbulos na escala nanométrica e se a distribuição era uniforme, as emulsões abaixo foram analisadas quanto ao tamanho de partícula, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1.2.:

- 2C/1U, valor de EHL 13,0 par J (*Ceteareth 20/Ceteareth 5*);
- 2C/1U, valor de EHL 13,0 par N (*Steareth 21/Steareth 2*);
- 2C/1U, valor de EHL 13,0 par D (*Ceteareth 20/Steareth 2*);
- 2C/1U, valor de EHL 13,0 par O (*Steareth 21/Ceteareth 5*).

O resultado da análise de distribuição do tamanho de partícula das emulsões listadas acima será discutido posteriormente no item 4.8.1.2.

4.4. Influência da ordem de adição no processo de obtenção das emulsões

A influência da ordem de adição foi testada conforme metodologia descrita no item 3.2.4. Apenas a emulsão 5, preparada conforme metodologia abaixo, apresentou-se estável.

Emulsão 05: em um béquer foi pesada a água e em outro béquer a fase oleosa e os tensoativos hidrofílico e lipofílico. Após aquecimento, submete-se a fase oleosa à agitação com agitador mecânico, a 600 rpm e verte-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação, até a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

O método utilizado para produção da nanoemulsão, proposto neste trabalho é o método de inversão de fase (EPI), que promove a formação dos glóbulos através da alteração do tipo de emulsão durante o processo de emulsificação, inicialmente a emulsão é do tipo A/O e, conforme aumenta-se o conteúdo de água, a emulsão se torna O/A.

Assim sendo, a ordem de adição dos componentes e a metodologia utilizada tornam-se essenciais para a obtenção do produto desejado.

O método de preparo da emulsão 1 resultou na formação de uma emulsão instável e seria necessário estudar alternativas para estabilizar a emulsão pretendida. Portanto, consideramos que este método não satisfaz os critérios para formação da nanoemulsão proposta neste trabalho.

O método aplicado para produção da emulsão 02, onde todos os componentes foram pesados no mesmo béquer e agitados, à 600 rpm, à temperatura ambiente mostra-se ineficiente tanto pelas razões já expostas para a emulsão 1 quanto pelo fato de que os tensoativos utilizados são sólidos à temperatura ambiente e, portanto, não seriam solubilizados na mistura de fases, o que impede o tensoativo de colocar-se na interface dos glóbulos para estabilizar a emulsão.

As propostas 3 e 4 para preparação das emulsões, onde os tensoativos são separados entre as fases aquosa e oleosa ou misturados à fase aquosa, também resultaram em emulsões instáveis. Quando a água é adicionada à mistura de óleos e tensoativos, o processo de formação da nanoemulsão ocorre em duas etapas. Inicialmente, ocorre a formação de uma emulsão água em óleo, com gotículas de água dispersas no óleo limitadas pelo filme de tensoativo. Com o aumento do volume de água, ocorre a agregação das gotículas, originando uma camada bicontínua ou lamelar, que se rompe e ocorre a inversão da curvatura do tensoativo, formando a nanoemulsão. Sendo assim, como nos métodos de preparo 3 e 4 não há a formação da camada bicontínua ou lamelar, não há a alteração de curvatura e a nanoemulsão não se forma (FERNANDEZ et al., 2004).

A emulsão 5 foi a única preparada de acordo com a metodologia PIC (*Phase Inversion Composition*), resultando em uma nanoemulsão estável.

O método PIC favorece a formação de glóbulos de tamanho nanométrico pela inversão da curvatura do tensoativo (figura 14). A adição da fase aquosa à mistura de fase oleosa e tensoativos forma, inicialmente, um glóbulo onde a parte hidrofílica do tensoativo está direcionada para a parte interna do glóbulo, onde está a fase aquosa. Com o aumento da concentração de água, ocorre uma alteração na curvatura do tensoativo, pelo equilíbrio entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, formando estruturas bicontínuas ou lamelares. Quando a composição de água aumenta, a curvatura se inverte, levando à formação de glóbulos de tamanho reduzido (SOLANS; SOLÉ, 2012).

Figura 14 - Mecanismo de inversão da curvatura do tensoativo e formação dos glóbulos da nanoemulsão.

Fonte: elaborado pela autora

4.5. Influência da velocidade de agitação na estabilidade e no tamanho de partícula

A avaliação das nanoemulsões preparadas conforme a metodologia descrita no item 3.2.5. foi realizada após 24 h do preparo das emulsões. Foram avaliadas nanoemulsões preparadas com a mistura de óleos na proporção de 2C/1U empregando par de tensoativos *Ceteareth 20/ Ceteareth 5*, no valor de EHL 13,0.

Após a centrifugação as emulsões mostraram-se macroscopicamente estáveis e também foram empregadas para determinação do tamanho de partícula.

A emulsão preparada a 600 rpm apresenta tamanho médio de partícula de 308 nm, com PdI (*Polidispersion Index*) de 0,233. O PdI determina a homogeneidade da emulsão e valores próximos a 0,1 são indicativos de emulsões monodispersas. A emulsão preparada a 600 rpm apresentou uma pequena população (5,0%) na região de 70,2 nm e maioria dos glóbulos (95,0%) na região de 334,5 nm. O gráfico com a distribuição por intensidade pode ser visto na figura 15.

Figura 15 - Distribuição de tamanho por intensidade da nanoemulsão preparada a 600 rpm.

A emulsão preparada a 900 rpm apresentou tamanho médio de partícula de 350,1 nm e Pdl de 0,204. Apresentou também uma população de intensidade 92,1% na região de 448 nm e outra de intensidade 7,9% na região de 128,2 nm. A distribuição está apresentada na figura 16.

Figura 16 - Distribuição de tamanho por intensidade da emulsão preparada a 900 rpm.

A emulsão preparada a 1.200 rpm apresentou tamanho médio de partícula de 318 nm e Pdl de 0,268. Como as emulsões anteriores, também apresentou duas populações, com

intensidade de 85,9% em 461,5 nm e 14,1% em 99,13 nm. A distribuição de tamanho por intensidade está apresentada na figura 17.

Figura 17 - Distribuição de tamanho por intensidade da nanoemulsão preparada a 1.200 rpm.

O tamanho de partícula resultante da preparação de nanoemulsões pelo método de inversão de fases (EPI) está baseado na alteração da curvatura espontânea do tensoativo, pela alteração no tipo de emulsão de A/O para O/A, com a adição do volume total de água ao sistema (FERNANDEZ et al., 2004).

Sendo assim, o resultado obtido é coerente com a técnica de preparação utilizada (PIC) e a emulsão escolhida para continuidade dos estudos é a preparada com velocidade de 600 rpm.

4.6. Determinação do tipo de emulsão: teste de diluição

O teste realizado nas emulsões preparadas com a mistura dos óleos de café e urucum demonstrou que as emulsões são do tipo óleo em água (O/A), pois houve homogeneização completa da água com as emulsões, não formando grumos ou separação de fases após 48 h.

4.7. Preparo da nanoemulsão aditivada

A nanoemulsão descrita na tabela 9 apresenta aspecto leitoso, característica esperada por apresentar tamanho médio dos glóbulos situado entre 200 nm e 500 nm (YUKUYAMA et

al., 2015). A cor é amarelada, causada pela coloração dos óleos, principalmente o óleo de urucum e o aroma é característico do óleo de café.

Para aditivação da nanoemulsão o ativo “retinóide-like” foi adicionado na fase oleosa e o ativo hidratante foi adicionado à mistura de modificador reológico.

Com a finalidade em aumentar a viscosidade da nanoemulsão, e limitar a espalhabilidade na pele, foi testado a adição de modificador reológico. Além disso, para aditivação da nanoemulsão com dióxido de titânio (filtro solar físico) seria necessário que a nanoemulsão tivesse viscosidade suficiente para mantê-lo em suspensão na fase externa.

Para aumentar a viscosidade foram feitos testes de diferentes proporções de modificador reológico (item 3.1.4.) e filtro físico (*Titanium dioxide*), com o objetivo de obter um produto final com viscosidade adequada para manter em suspensão a quantidade de filtro físico proposta.

Assim, foram preparadas soluções, conforme as proporções indicadas na tabela 12, para verificar a estabilidade e a viscosidade resultantes e subsidiar a escolha da proporção a ser utilizada para aditivação da nanoemulsão. Foi verificado que o uso de 1,0% de modificador reológico resultou numa solução muito viscosa e, portanto, não foram testadas proporções maiores.

Tabela 12 - Soluções utilizadas para escolha da proporção entre o modificador reológico e o filtro físico.

Solução	Porcentagem de modificador reológico % (m/m)	Porcentagem de filtro físico % (m/m)
1	0,5	0,5
2	0,5	1,0
3	1,0	1,0

As soluções foram preparadas e adicionadas à nanoemulsão na proporção de 30,0% da solução contendo modificador reológico e 70,0% da nanoemulsão, resultando nas nanoemulsões aditivadas.

A nanoemulsão aditivada preparada com a solução 2 apresentou instabilidade após centrifugação, provavelmente pela adição do dióxido de titânio, que é um pó, num sistema que não tinha viscosidade suficiente para mantê-lo em suspensão. As nanoemulsões aditivadas com as soluções 1 e 3 apresentaram-se estáveis após a centrifugação.

Como o objetivo da adição do dióxido de titânio é agir como fator de proteção solar, a emulsão 3 foi a escolhida para a continuidade dos estudos.

4.8. Teste de estabilidade

4.8.1. Testes preliminares de estabilidade das nanoemulsões

4.8.1.1. Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica das nanoemulsões preparadas com a mistura dos óleos de café e de urucum revelou que as nanoemulsões mais estáveis foram as preparadas com a mistura de óleos na proporção 2C/1U, valor de EHL 13,0 com os pares de tensoativos J (*Ceteareth 20/Ceteareth 5*), N (*Steareth 21/Steareth 2*), D (*Ceteareth 20/Steareth 2*) e O (*Steareth 21/Ceteareth 5*).

4.8.1.2. Determinação do tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade

As nanoemulsões consideradas estáveis na avaliação macroscópica foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersividade (figuras 18 a 21).

Figura 18 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par J de tensoativos (*Ceteareth 20/Ceteareth 5*).

Figura 19 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par N de tensoativos (*Steareth 21/Steareth 2*).

Figura 20 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par D de tensoativos (*Ceteareth 20/Steareth 2*).

Figura 21 - Distribuição granulométrica da emulsão preparada com o par O de tensoativos (*Steareth 21/Ceteareth 5*).

A nanoemulsão preparada com par de tensoativo **J** apresentou apenas uma população de partículas, com diâmetro médio de 363,2 nm e índice de polidispersividade (PdI) de 0,117.

O índice de polidispersividade é uma grandeza adimensional, calculada pelo equipamento, que indica a distribuição dos tamanhos de partícula na amostra. Valores de PdI muito pequenos e próximos a 0,05 não são frequentes e indicam alto grau de uniformidade no tamanho das partículas (monodispersão). Já valores acima de 0,7 indicam uma distribuição muito heterogênea, comprometendo a capacidade do equipamento de oferecer uma leitura adequada (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2011).

O uso do par de tensoativos **N** originou uma emulsão com tamanho médio de partícula de 505,6 nm e PdI de 0,596. A análise revelou duas populações de tamanhos diferentes, correspondendo a 84,1 e 15,9 % do total, indicando distribuição não homogênea das partículas na emulsão.

Como demonstra a figura 10, a emulsão preparada com par de tensoativos **D** também apresentou duas populações de partículas, correspondentes a 79 e 21% do total, demonstrando a heterogeneidade da emulsão. Apesar do tamanho médio das partículas ser 166,5 nm, o PdI foi de 0,605, o que confirma que a emulsão não apresentou-se homogênea.

A análise da emulsão preparada com par de tensoativos **O** revelou uma emulsão com tamanho médio de partícula de 443,3 nm e PdI de 0,180, também apresentando apenas uma população.

Considerando tanto o tamanho de partícula quanto o Pdl, a nanoemulsão preparada com o par *J* foi a escolhida para a continuidade dos estudos e sua composição está apresentada na tabela 13.

Tabela 13 - Composição da nanoemulsão.

Matéria prima	Porcentagem utilizada % (m/m)
Óleo de café	3,3
Óleo de urucum	1,7
<i>Ceteareth 20</i>	2,8
<i>Ceteareth 5</i>	2,2
Água purificada	90,0

4.8.1.3. Determinação do valor de pH

Para verificação do valor de pH (item 3.2.8.1.3) foram preparadas 3 diluições da nanoemulsão descrita na tabela 11. O valor médio de pH encontrado, após 24 h, foi de $4,64 \pm 0,02$, no valor de temperatura de $29,2 \pm 1,0$ °C.

O valor de pH da pele normal é ligeiramente ácido, variando entre 4,0 e 6,0 e a manutenção dessa faixa de valores é importante para a atividade de enzimas envolvidas na produção de ceramidas, controle da flora normal e para a integridade do estrato córneo (ALI; YOSIPOVITCH, 2013). Assim, o valor de pH da formulação proposta é compatível com o pH da pele.

4.8.1.4. Estresse térmico

A nanoemulsão estável na avaliação macroscópica (item 4.7.1.1.), foi submetida ao teste do estresse térmico (item 3.2.8.1.5.).

O teste de estresse térmico visa submeter o produto a condições de temperaturas crescentes, para tentar acelerar o aparecimento de sinais de instabilidade. A análise foi realizada em triplicata e a nanoemulsão permaneceu macroscopicamente estável, após ser submetida ao estresse térmico e depois da centrifugação (item 3.2.8.1.1.).

4.8.1.5. Ciclo gela-degela

A nanoemulsão apresentada no item 4.8.1.2. (tabela 10), foi submetida ao ciclo gela-degela (item 3.2.8.1.6.). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados na tabela 14.

A aparência da nanoemulsão não foi alterada durante o ciclo, mantendo-se a cor amarelada e o odor característico.

Os valores de pH tiveram variação de 0,02 e condutividade de 0,28 $\mu\text{S}/\text{cm}$, porém, houve aumento de 22 % no tamanho de partícula - de 442,7 nm para 563,37 nm – indicando possíveis sinais de instabilidade da nanoemulsão submetida ao ciclo gela-degela.

Tabela 14 - Análise da nanoemulsão submetida ao ciclo gela-degela.

•		Antes do ciclo			6º dia do ciclo				12º dia do ciclo			
Amostra	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI
1	5,93	30,04	456,10	0,17	5,89	29,81	597,60	0,29	6,18	31,04	572,10	0,25
2	5,91	34,99	433,10	0,01	5,85	28,71	513,40	0,23	5,73	27,55	624,90	0,33
3	5,87	27,70	437,00	0,04	5,90	28,48	495,60	0,13	5,85	33,31	493,10	0,30
Média	5,90	30,91	442,07	0,07	5,88	29,00	535,53	0,22	5,92	30,63	563,37	0,29
DP	0,02	3,04	10,05	0,07	0,02	0,58	44,49	0,07	0,19	2,37	54,16	0,03

Legenda: Cond.: Condutividade; TP: Tamanho de Partícula, PdI: Índice de Polidispersividade, DP: Desvio Padrão

4.8.2. Testes preliminares de estabilidade da nanoemulsão aditivada

4.8.2.1. Avaliação macroscópica

As nanoemulsões aditivadas foram preparadas utilizando-se a proporção de 30,0% de solução do modificador reológico e 70,0% de nanoemulsão, conforme metodologia descrita no item 3.2.7.

As soluções de modificador reológico e filtro físico foram preparadas conforme proporções apresentadas na tabela 12 (item 4.7.).

Após 24 da preparação, as nanoemulsões aditivadas foram centrifugadas, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1.1., e avaliadas macroscopicamente (figura 22).

Figura 22 - Aspecto das nanoemulsões aditivadas, com diferentes proporções de modificador reológico, evidenciando a sedimentação na formulação 2.

Legenda: 1. Nanoemulsão aditivada com 0,5% de modificador reológico e 0,5% de filtro físico; 2. Nanoemulsão aditivada com 0,5% de modificador reológico e 1,0% de filtro físico; 3. Nanoemulsão aditivada com 1,0% de modificador reológico e 1,0% de filtro físico

Fonte: elaborada pela autora

A nanoemulsão aditivada 2 apresentou sedimentação, provavelmente porque a proporção utilizada de modificador reológico não foi suficiente para manter o filtro físico em suspensão.

Como o objetivo da inclusão do filtro físico era avaliar a proteção UV, optou-se por continuar os estudos com a nanoemulsão aditivada com 1,0% de modificador reológico e 1,0% de filtro físico (nanoemulsão 3).

4.8.2.2. Determinação do tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade

A nanoemulsão aditivada foi avaliada com relação ao tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.1.2. O teste foi realizado em triplicata e os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 15 - Tamanho de partícula e PDI das amostras de nanoemulsão aditivada.

	Tamanho de partícula (nm)	PdI
Amostra 1	274,3	0,148
Amostra 2	211,4	0,160
Amostra 3	338,4	0,049
Média	274,7	0,119
DP	51,84	0,049

Legenda: PDI = Índice de Polidispersividade, DP = Desvio Padrão

As nanoemulsões aditivadas apresentaram apenas uma população de partículas, indicando uniformidade, conforme demonstra o baixo índice de polidispersividade (figura 23). A adição do modificador reológico não provocou aumento do tamanho de partícula da nanoemulsão aditivada, conforme resultados apresentados no item 4.8.1.2. Naquela análise, o tamanho de partícula médio da nanoemulsão foi 363,2 nm e índice de polidispersividade (PDI) de 0,117. Após a aditivação o tamanho médio encontrado foi de 274,7 nm e PDI 0,119, demonstrando que o modificador reológico promove o aumento da viscosidade sem aumentar o tamanho da partícula, o que favorece o seu uso em sistemas onde o tamanho diminuto da partícula é importante.

Figura 23 - Distribuição de tamanho por intensidade das amostras de nanoemulsão aditivada.

4.8.2.3. Estresse térmico

A análise foi realizada em triplicata e a nanoemulsão aditivada permaneceu macroscopicamente estável, após ser submetida ao estresse térmico e depois da centrifugação (item 3.2.8.1.1.).

4.8.2.4. Ciclo gela-degela

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados na tabela 16.

A aparência da nanoemulsão aditivada não foi alterada durante o ciclo, mantendo-se a cor característica.

Os valores de pH das amostras tiveram pouca variação, porém a variação observada nos valores de condutividade e tamanho de partícula revelam um indicativo de instabilidade da formulação (ANVISA, 2004).

Tabela 16 - Análise da nanoemulsão aditivada submetida ao ciclo gela-degela.

• Amostra	Antes do ciclo				6º dia do ciclo				12º dia do ciclo			
	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI	pH	Cond. (μ S/cm)	TP (nm)	PdI
1	6,79	556,40	274,30	0,15	6,60	424,90	337,50	0,44	6,71	511,00	417,9	0,533
2	6,66	554,50	211,40	0,16	6,60	447,20	316,50	0,31	6,70	488,70	735,8	0,356
3	6,73	535,90	338,40	0,05	6,55	502,80	307,10	0,29	6,71	561,30	442,7	0,344
Média	6,73	548,93	274,70	0,12	6,58	458,30	320,37	0,35	6,71	520,33	532,13	0,41
DP	0,05	9,25	51,85	0,05	0,02	32,76	12,71	0,07	0,00	30,36	144,37	0,09

Legenda: Cond.: Condutividade; TP: Tamanho de Partícula, PdI: Índice de Polidispersividade, DP: Desvio Padrão

4.8.3. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

4.8.3.1. Óleos de café e urucum e da mistura de óleos

A atividade antioxidante dos óleos de café e urucum e da mistura dos óleos, na proporção utilizada na nanoemulsão e na nanoemulsão aditivada (2 partes de óleo de café para 1 parte de óleo de urucum) foi avaliada conforme metodologia descrita no item 3.2.9.

As amostras foram avaliadas em concentrações crescentes, para obtenção de curva de calibração que possibilitasse o cálculo do IC₅₀, isto é, concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH[•] em solução.

As curvas de calibração da avaliação da atividade antioxidante dos óleos e da mistura dos óleos estão nas figuras de 24 a 26.

Figura 24 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo de café verde.

Figura 25 - Curva de calibração da atividade antioxidante do óleo de urucum.

Figura 26 - Curva de calibração da atividade antioxidante da mistura de óleos de café e urucum, na proporção 2:1.

A partir da equação da reta gerada pelos gráficos, é possível calcular o IC_{50} de cada amostra, apresentada na tabela 18.

Tabela 17 - Valores de IC₅₀ dos óleos.

Amostra	IC ₅₀ (µl/ml)
Óleo de café	378,02
Óleo de urucum	717,15
Óleo de café e óleo de urucum (2:1)	497,76

Os valores de IC₅₀ encontrados para os óleos de café e urucum demonstram atividade antioxidante dos óleos em altas concentrações, sendo a atividade antioxidante do óleo de café maior que do óleo de urucum.

O óleo de café vem sendo pesquisado pela sua capacidade antioxidante, principalmente devido à presença de diterpenos como caveol e cafestol (PEREDA et al., 2009). Porém, os resultados deste estudo demonstraram que a quantidade de óleo de café puro necessária para promover atividade antioxidante é alta.

CHIARI et al., 2014 obtiveram melhores resultados para a ação antioxidante do óleo de café verde, utilizando a técnica do DPPH, com IC₅₀ = 4,60 mg/ml.

A mistura dos óleos na proporção de 2:1, utilizada na nanoemulsão, demonstra capacidade antioxidante também somente em altas concentrações. A mistura dos óleos apresentou IC₅₀ de 497,76 µl/ml, ou seja, 0,497 ml da mistura para 1 ml de solução, sem considerar os efeitos das outras matérias primas, que podem ter efeito sinérgico ou inibitório na atividade antioxidante. Na nanoemulsão aqui estudada a mistura de óleos está na proporção de 5%, ou seja, bem menor que a concentração necessária para atingir o IC₅₀.

A figura 27 apresenta a relação entre as atividades dos dois óleos e da mistura.

Figura 27 - Relação entre a porcentagem de redução da atividade do DPPH e a concentração dos óleos de café e urucum e a mistura dos óleos, na proporção 2C:1U.

4.8.3.2. Nanoemulsão e nanoemulsão aditivada

A análise da nanoemulsão e nanoemulsão aditivada revelou não haver atividade antioxidante nas formulações, com valores de absorbância das amostras muito próximos ao valor do controle positivo, resultando em valores negativos de redução, quando calculada a média dos valores de absorbância. Assim, não foi possível a construção da curva de calibração para a nanoemulsão e nanoemulsão aditivada.

Como já discutido anteriormente, a quantidade da mistura de óleos utilizada na nanoemulsão está muito abaixo do valor de IC_{50} . A atividade antioxidante da nanoemulsão baseava-se na atividade antioxidante dos óleos, visto que os ativos adicionados não tinham essa propriedade. Assim, para que a nanoemulsão apresente atividade antioxidante seria necessário aumentar a quantidade da mistura de óleos ou adicionar outros ativos que tenham essa capacidade.

Outra possibilidade é que a metodologia de avaliação da atividade antioxidante por DPPH, pode ter influenciado nos resultados. O método DPPH é o mais utilizado, porém para algumas substâncias e preparações são necessários outros métodos para caracterizar um composto como antioxidante. O método continua sofrendo diversas adaptações e modificações, com vários procedimentos e protocolos diferentes sendo propostos, incluindo diferentes solventes, diferentes concentrações iniciais de DPPH, diferentes tempos de reação, etc (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2015).

Considerando as variáveis envolvidas e para se ter certeza da ausência de atividade

antioxidante, seriam necessárias novas análises, inclusive utilizando outras metodologias para concluir sobre a atividade antioxidante da nanoemulsão.

4.8.4. Avaliação *in vitro* do Fator de Proteção Solar

A avaliação foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.2.11.

O equipamento utilizado realiza a exposição da amostra à luz emitida por uma lâmpada de xenônio e mede, através de uma esfera de integração, que coleta a luz dispersada em todos os ângulos, fazendo medições entre os comprimentos de onda UV de 250 a 400 nm. Os resultados gráficos são expressos em relação ao fator de proteção monocromático por comprimento de onda. O fator de proteção monocromático (*Monochromatic Protection Factor*, MPF) corresponde ao inverso da transmitância em determinado comprimento de onda, fator utilizado pelo equipamento para cálculo do FPS da amostra.

Os resultados das análises para a nanoemulsão estão apresentados na figura 28.

Figura 28 - Análise do MPF da nanoemulsão, nos diversos comprimentos de onda.

O valor de FPS da nanoemulsão, também calculado pelo equipamento, foi de $1,11 \pm 0,02$.

A nanoemulsão aditivada também foi submetida à análise e os resultados estão na figura 29.

Figura 29 - Análise do MPF da nanoemulsão aditivada, nso diversos comprimentos de onda.

O valor de FPS calculado pelo equipamento foi de $1,69 \pm 0,16$. Os resultados mostraram que a quantidade de dióxido de titânio adicionada na formulação não foi suficiente para conferir um valor significativo de FPS à nanoemulsão aditivada.

Emulsões contendo óleo de café apresentam efeito sinérgico quando utilizados com protetores solares químicos, promovendo o aumento do FPS (CHIARI et al., 2014).

WAGEMAKER (2009) estudou o FPS de diversas espécies de café e encontrou, para o óleo de café arábica o valor de FPS de 1,97, utilizando o método de Mansur, que não será aplicado neste trabalho, pois a metodologia não pode ser empregada para avaliação de fotoprotetores físicos, devido à sua insolubilidade nos solventes comumente utilizados (VELASCO et al., 2011).

Assim, a nanoemulsão aditivada não apresentou valor significativo de FPS, com a utilização da metodologia aqui apresentada. Vale lembrar que a metodologia *in vitro* é utilizada para seleção prévia de formulações, pois a metodologia aceita pela ANVISA para determinação de FPS é a avaliação *in vivo*. O uso de técnicas *in vitro* como a empregada neste estudo pode facilitar a seleção de formulações e ajudar a prever interações que podem interferir no desempenho de um fotoprotetor, melhorando a segurança dos testes *in vivo* (VELASCO et al., 2011).

4.8.5. Avaliação da oclusividade da emulsão

A oclusividade (item 3.2.12.) foi avaliada comparando-se a nanomulsão com a nanoemulsão aditivada (NA) completa, NA apenas com o ativo hidratante e NA apenas com o ativo “retinóide-like”.

A perda de água foi verificada através da pesagem da célula de gelatina, antes e depois da aplicação das amostras e os valores de oclusividade calculados estão na tabela 19.

Tabela 18 - Valores de oclusividade das nanoemulsões.

	Oclusividade (%)		
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa
	(25-50 min)	(50-100 min)	(100-150 min)
Nanoemulsão	48,52	73,27	73,97
Nanoemulsão aditivada (NA)	22,83	57,38	59,42
NA sem aditivo hidratante	45,43	64,29	66,57
NA sem aditivo "retinóide-like"	34,44	66,78	71,56

Figura 30 - Perda de água por minuto antes da aplicação das nanoemulsões.

Figura 31 - Perda de água por minuto após a aplicação das nanoemulsões.

Os resultados apresentados nas figuras 30 e 31 demonstram uma constância na quantidade de perda de água, após a aplicação das amostras nas células. Os valores de oclusividade demonstrados pelas amostras demonstram que os componentes que mais colaboram para a oclusividade são a nanoemulsão e o ativo hidratante.

A nanoemulsão aditivada aumentou sua capacidade oclusiva ao longo da análise, sugerindo que a permanência da formulação na pele pode reduzir a perda transepidérmica de água para o ambiente e melhorar a hidratação da pele (tabela 19).

A oclusividade é um dos mecanismos fundamentais, juntamente com a umectação e a emoliência, para a manutenção da hidratação da pele. Os umectantes atraem água da derme e do ambiente para a epiderme, sendo os mais eficientes os polióis, como o glicerol, que se liga a água na epiderme, impedindo a perda transepidérmica (TEWL). Os emolientes são lipídeos que, aplicados sobre a pele, promovem oclusão parcial e, geralmente por serem similares à composição lipídica da pele, auxiliam na restauração e manutenção da função de barreira da pele. Os agentes oclusivos formam uma barreira na superfície da pele, impedindo a TEWL (RAWLINGS; CANESTRARI; DOBKOWSKI, 2004).

4.8.6. Avaliação do perfil de viscosidade da nanoemulsão aditivada

A avaliação do perfil reológico foi feita conforme metodologia descrita no item 3.2.13.

A figura 32 mostra o perfil de viscosidade da nanoemulsão aditivada, caracterizado como não Newtoniano, pois a viscosidade varia com a taxa de cisalhamento. A emulsão pode ser caracterizada como tixotrópica, pois exibe um decréscimo na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, que não é completamente recuperada ao final do teste. . A diferença entre as duas curvas ascendente e descendente, originando a área chamada de histerese, é causada pela diminuição da viscosidade com o aumento do tempo de cisalhamento, e algumas preparações podem nunca recuperar a viscosidade após o cisalhamento. Outras, se mantidas em repouso, retornam à viscosidade inicial. Esse “relaxamento” da viscosidade pode favorecer a liberação de ativos da formulação, durante o espalhamento mecânico na pele (BROOKFIELD ENGINEERING LABS., INC, 2014; ISAAC et al., 2015).

Figura 32 - Perfil de viscosidade da nanoemulsão aditivada.

Sistemas emulsionados geralmente apresentam fluxo não-Newtoniano, onde a viscosidade depende da taxa de cisalhamento. Para produtos cosméticos, a característica de fluxo não-Newtoniano pseudo-plástico é interessante, pois a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento favorece a espalhabilidade da formulação, e a reversibilidade da viscosidade quando cessa o cisalhamento favorece a boa cobertura e a manutenção do produto na pele (TOPAN, 2012)

4.8.7. Análise sensorial

A análise foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.2.14. e aprovação pelo protocolo CEP/FCFRP nº 388, CAAE 48420815.1.0000.5403, parecer 1593351 (Anexo II).

Com relação à análise descritiva, a nanoemulsão foi descrita pelo painel como opaca e fluida, com alta espalhabilidade, não provoca branqueamento da pele e deixa resíduo aquoso. Já a nanoemulsão aditivada foi descrita como opaca, fluida, com baixa pegajosidade pré e pós aplicação, alta espalhabilidade, não provoca branqueamento da pele e deixa um resíduo aquoso pós aplicação (figura 33).

Figura 33 - Caracterização sensorial da NA e NA aditivada, comparadas com o produto comercial.

No teste triangular, que visa avaliar se o produto é diferente a um padrão apresentado, 100% dos painelistas diferenciaram a nanoemulsão aditivada do produto comercial.

No teste de aceitação, a nanoemulsão aditivada foi bem avaliada e os resultados estão na figura 34.

Figura 34 - Teste de aceitação da NA aditivada, em comparação ao produto comercial.

Comparado com o produto comercial, a nanoemulsão aditivada apresentou boa aceitação pelo painel treinado, com a maior parte das avaliações entre “muito bom” e “bom” (57% das respostas).

No teste de intenção de compra (figura 35), a nanoemulsão foi bem avaliada pelo painel treinado, com 64% das respostas entre “provavelmente compraria” e “talvez sim, talvez não”. Neste teste também são questionados os motivos da intenção ou rejeição de compra e os motivos apontados que motivariam a compra foram o toque suave, a facilidade de aplicação e a sensação agradável deixada na pele após a aplicação (toque seco e suavidade da pele).

Os motivos para a rejeição da nanoemulsão aditivada foram, principalmente o odor e a sensação na pele após a aplicação.

Figura 35 - Teste de intenção de compra da NA, em comparação ao produto comercial.

No teste de preferencia, que compara diretamente as duas amostras, a nanoemulsão aditivada apresenta boa performance, com metade dos respondentes preferindo-a ao produto comercial (figura 36).

Figura 36 - Teste de preferência, comparando a NA com o produto comercial.

Os resultados apresentados não permitem afirmar que a nanoemulsão aditivada é melhor ou pior que o produto comercial, mas traz informações sobre as características que foram consideradas como desejáveis pelo painel treinado e que poderão ser percebidas pelo consumidor, levando-o a comprar ou rejeitar o produto.

A análise sensorial traz informações importantes para a melhoria das características da formulação que são importantes para o painel treinado, subsidiando alterações que podem ser feitas para a melhoria das características da formulação. O uso do painel treinado proporciona resultados diferenciados, já que os painelistas têm clareza dos conceitos utilizados e podem fornecer percepções mais precisas (VIEIRA, 2015).

5. Conclusões

A partir dos resultados experimentais concluímos que foi possível obter nanoemulsões a partir da mistura de óleo de café e óleo de urucum, na proporção 2:1, com tamanho de partícula de 363,2 nm e distribuição homogênea ($PdI = 0,117$), com os tensoativos *Ceteareth 20* e *Ceteareth 5* e valor de EHL igual a 13, com a utilização do método PIC, que propicia a formação de glóbulos de tamanho nanométrico por inversão da curvatura do tensoativo, causada pela inversão de fases da emulsão.

A partir dessa nanoemulsão foi possível criar uma nanoemulsão aditivada, utilizando modificador reológico, filtro físico e aditivos hidratantes e “retinóide-like”, com tamanho de partícula de diâmetro médio 272,7 nm.

Tanto a nanoemulsão quanto a nanoemulsão aditivada apresentaram aumento do tamanho de partícula quando submetidas ao ciclo gela-degela, podendo ser indicação de instabilidade. Assim, estudos adicionais podem ser necessários para investigar e aprimorar a estabilidade da nanoemulsão e da nanoemulsão aditivada.

Os valores de pH da nanoemulsão e da nanoemulsão aditivada mostraram-se compatíveis com o pH da pele, ficando em valores médios de 4,64 para a nanoemulsão e 6,73 para a nanoemulsão aditivada.

O efeito antioxidante reportado dos óleos de café e urucum não foram observados na nanoemulsão aditivada, com a utilização do método DPPH. Outros métodos de avaliação da capacidade antioxidante poderão ser utilizados para verificar os resultados aqui encontrados.

Apesar da adição do filtro físico e do uso tradicional do óleo de urucum como protetor contra os efeitos da radiação solar, o valor de FPS encontrado pela metodologia *in vitro* utilizada foi baixo. Novos testes, bem como a avaliação *in vivo*, podem ser realizados para verificar os resultados.

A nanoemulsão aditivada apresentou bons resultados nos testes de oclusividade, e do perfil de viscosidade, sugerindo uma boa característica cosmética, favorecendo a hidratação da pele.

Nos testes de análise sensorial a nanoemulsão aditivada foi bem avaliada pelo painel treinado, sendo preferida por metade dos painelistas, quando comparada ao produto comercial, demonstrando seu potencial para ser transformada em um produto comercial.

6. Bibliografia

- ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants Used in Cosmetics. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 987–1000, 1 nov. 2003.
- ALI, S.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. **Acta Dermato Venereologica**, v. 93, n. 3, p. 261–267, 2013.
- ALVAREZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y aceites**, v. 51, n. 1–2, p. 74–96, 2000.
- ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Editora Anvisa, 2004.
- BONTÉ, F. Skin moisturization mechanisms: New data. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 69, n. 3, p. 135–141, maio 2011.
- BRACONI, F.; OLIVEIRA, I.; BARONI, M.; ROCHA FILHO, P. Aplicação cosmética do óleo de canola. **Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos**, v. 12, p. 6–19, 1995.
- BRESOLIN, T. M. B.; DAL MAS, J.; ZERMIANI, T.; THIESEN, L.; SILVEIRA, J. L. M.; SILVA, K. A. B. S.; SOUZA, M. M.; MALHEIROS, A.; LUCINDA-SILVA, R. M. Nanoemulsion as a Carrier to Improve the Topical Anti-Inflammatory Activity of Stem Bark Extract of *Rapanea Ferruginea*. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 4495–4507, set. 2016.
- BROOKFIELD ENGINEERING LABS., INC. **More solutions to sticky problems**. Disponível em: <http://www.brookfieldengineering.com/download/files/more_solutions.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2016.
- CERQUEIRA-COUTINHO, C.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; DOS SANTOS, E.; MANSUR, C. R. Development of a Photoprotective and Antioxidant Nanoemulsion Containing Chitosan as an Agent for Improving Skin Retention. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 6, p. 593–604, set. 2015.
- CORREA, M. A.; KUREBAYASHI, A. K.; ISAAC, V. L. B. **Cosmetologia - Ciência e Técnica**. 1. ed. [s.l.] MEDFARMA, 2012.
- CORREA, M. A.; KUREBAYASHI, A. K.; ISSAC, V. L. B. **COSMETOLOGIA - CIENCIA E TECNICA**. 1st. ed. [s.l.] MEDFARMA, 2012.
- COSTA, C. K.; SILVA, C. B.; LORDELLO, A. L. L.; ZANIN, S. M. W.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Identification of δ Tocotrienols and Fatty Acids in Fixed Oil of Annatto (*Bixa Orellana* Linné). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 508–512, 2013.
- FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-Emulsion Formation by Emulsion Phase Inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, dez. 2004.
- FLORENCE, A. T., A. D. **Princípios Físico Químicos em Farmácia**. 3.ed ed. São Paulo:

EDUSP, 2003.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, Abril 2001.

FOWLER, J. Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. **Pract Dermatol**, p. 36–40, 2012.

GANTA, S.; SINGH, A.; RAWAL, Y.; CACACCIO, J.; PATEL, N. R.; KULKARNI, P.; FERRIS, C. F.; AMIJI, M. M.; COLEMAN, T. P. Formulation development of a novel targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 958–970, 23 mar. 2016.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by“ HLB”. **J Soc Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.

GUMIERO, V. C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões à base de óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*) e extratos vegetais (*Areca catechu*, *Glycyrrhiza glabra* e *Portulaca oleracea*) para uso pós-sol**. 2011. Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-30112011-084007/>>. Acesso em: 23 set. 2015.

HETTIARACHCHI, D.; LIU, Y.; FOX, J.; SUNDERLAND, B. Western Australian Sandalwood Seed Oil: New Opportunities. **Lipid Technology**, v. 22, n. 2, p. 27–29, Fevereiro 2010.

HUANG, L.; PETERMANN, M. An experimental study on rheological behaviors of paraffin/water phase change emulsion. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 83, p. 479–486, Abril 2015.

HWANG, Y. Y.; RAMALINGAM, K.; BIENEK, D. R.; LEE, V.; YOU, T.; ALVAREZ, R. Antimicrobial Activity of Nanoemulsion in Combination with Cetylpyridinium Chloride in Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3568–3575, 1 ago. 2013.

ISAAC, V. L. B.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; MARTO, J. M.; MORAES, J. D. D.; LEONE, B. A.; CORRÊA, M. A.; RIBEIRO, H. M. Rheology as a Tool to Predict the Release of Alpha-Lipoic Acid from Emulsions Used for the Prevention of Skin Aging. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

JACOBI, O. K. About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin. In: **Anais...** In: PROC SCI SECT TOILET GOODS ASSOC. 1959.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia basica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, Aging Facial Skin Lasers and Related Spectrum Technologies. v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011.

LODEN, M. The Clinical Benefit of Moisturizers. **Journal of the European Academy of**

Dermatology and Venereology, v. 19, n. 6, p. 672–688, nov. 2005.

LORENCINI, M.; BROHEM, C. A.; DIEAMANT, G. C.; ZANCHIN, N. I. T.; MAIBACH, H. I. Active Ingredients against Human Epidermal Aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100–115, maio 2014.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Dynamic Light Scattering - Common Terms Defined** Malvern Instruments Limited, , 2011. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2016.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-22102009-154453/>>. Acesso em: 29 set. 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, Setembro 2007.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. Universidade de São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-17012007-150546/>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P.; FILHO, P. A. R. Attainment of O/W Emulsions Containing Liquid Crystal from Annatto Oil (*Bixa Orellana*), Coffee Oil, and Tea Tree Oil (*Melaleuca Alternifolia*) as Oily Phase Using HLB System and Ternary Phase Diagram. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 297–306, 25 jan. 2008.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 249–256, jul. 2011.

NEEDS, A. time-saving guide to emulsifier selection. 1976.

NGAN, C. L.; BASRI, M.; TRIPATHY, M.; ABEDI KARJIBAN, R.; ABDUL-MALEK, E. Skin Intervention of Fullerene-Integrated Nanoemulsion in Structural and Collagen Regeneration against Skin Aging. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 22–28, abr. 2015.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, G. L. S. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, mar. 2015.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; BARROS-JÚNIOR, M. C. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 235–239, Abril 2006.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 241–249, 26 abr.

2002.

PASQUALI, R. C.; SACCO, N.; BREGNI, C. The studies on hydrophilic–lipophilic balance (HLB): sixty years after William C. Griffin’s pioneer work (1949–2009). **Lat Am J Pharm**, v. 28, n. 2, p. 313–317, 2009.

PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 44–51, Maio 2008.

PEREDA, M. D. C. V.; DE CAMPOS DIEAMANT, G.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; COLOMBI, D.; DI STASI, L. C.; DE SOUZA QUEIROZ, M. L. 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, n. 1, p. 56–62, 2009.

PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de naoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssgo: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. 2011. Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-10062011-094747/>>. Acesso em: 29 set. 2014.

PEREIRA, T.; GUERREIRO, C.; MARUNO, M.; FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. Exotic Vegetable Oils for Cosmetic O/W Nanoemulsions: In Vivo Evaluation. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 248, 24 fev. 2016.

PREVC, T.; ŠEGATIN, N.; POKLAR ULRIH, N.; CIGIĆ, B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. **Talanta**, v. 109, p. 13–19, Maio 2013.

PRISTA, L. N.; ALVES AC; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. [s.l.] Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v. 1

RAWLINGS, A. V.; CANESTRARI, D. A.; DOBKOWSKI, B. Moisturizer technology versus clinical performance. **Dermatologic Therapy**, v. 17, n. s1, p. 49–56, 2004.

ROCHA-FILHO, P. A.; MARUNO, M.; OLIVEIRA, B.; BERNARDI, D. S.; GUMIERO, V. C.; OTHERS. Nanoemulsions as a Vehicle for Drugs and Cosmetics. **Nanosci Technol**, v. 1, n. 1, p. 5, 2014.

ROCHA-FILHO, P.A., P. A. Occlusive Power Evaluation of O/W/O Multiple Emulsions on Gelatin Support Cells. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 19, n. 2, p. 65–73, 1 abr. 1997.

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

SANTOS, O. D. H.; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; AGUIAR, T. A.; ROCHA FILHO, P. A. Development of Vegetable Oil Emulsions with Lamellar Liquid-Crystalline Structures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 433–438, 22 fev. 2011.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; GULDAN, A.-C.; PAULUS, N.; RUNKEL, F. Multiple

W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 48–54, Dezembro 2010.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6a edição ed. [s.l: s.n.]

SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GREEN, K. J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 565–580, 23 ago. 2011.

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

SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of Nano-emulsion Preparation by Low-Energy Methods in an Ionic Surfactant System. **Langmuir**, v. 22, n. 20, p. 8326–8332, Setembro 2006.

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

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Emulsions, From Fundamentals to Practical Applications. v. 108–109, p. 227–258, 20 maio 2004.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Emulsions, From Fundamentals to Practical Applications. v. 108–109, p. 303–318, 20 maio 2004.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 175–183, Maio 2015.

TOPAN, J. F. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-21052012-104306/>>. Acesso em: 31 jan. 2015.

VELASCO, M. Val. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, Claudin. A. S. D.; KANEKO, T.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro)—revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27–34, 2011.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, Orthopaedic surgery: lower limb. v. 28, n. 10, p. 469–472, out. 2010.

VERDIER-SÉVRAIN, S.; BONTÉ, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 6, n. 2, p. 75–82, 2007.

VIEIRA, G. S. **Análise Sensorial: Terminologia, Desenvolvimento de Padrões e Treinamento de Painelistas para Avaliação de Produtos Cosméticos**. 2015. Universidade

de São Paulo, 2015.

VILAR, D. de A.; VILAR, M. S. de A.; MOURA, T. F. A. de L.; RAFFIN, F. N.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCO, C. F. de O.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. de F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of Bixa Orellana L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. e857292, 23 jun. 2014.

WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; BAGGIO, S. R.; GUERREIRO FILHO, O. Sun Protection Factor, Content and Composition of Lipid Fraction of Green Coffee Beans. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 469–473, mar. 2011.

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

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J.-C.; WONG, J. K. The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, fev. 2016.

YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: Process Selection and Application in Cosmetics – a Review. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 1–12, 1 jul. 2015.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/academica/article/viewArticle/494>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

ZOU, L.; AKOH, C. C. Antioxidant activities of annatto and palm tocotrienol-rich fractions in fish oil and structured lipid-based infant formula emulsion. **Food Chemistry**, v. 168, p. 504–511, Fevereiro 2015.

ANEXO I

Composição do produto comercial utilizado na análise sensorial das NAs, conforme descrito no rótulo

AQUA
HOMOSALATE
GLYCERIN ETHYLHEXYL SALICYLATE
ALCOHOL
OCTOCRYLENE
BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE
PROPYLENE GLYCOL
TITANIUM DIOXIDE
ISOHEXADECANE
ETHYLHEXYL TRIAZONE
POTASSIUM CETYL PHOSPHATE
GLYCERYL ISOSTEARATE
SYNTHETIC WAX
ACRYLATES / C10-30 ALKYL ACRYLATE CROSSPOLYMER
ALUMINUM HYDROXIDE
DISODIUM EDTA
GLYCERYL STEARATE
PALMITIC ACID
PEG-100 STEARATE
PHENOXYETHANOL
STEARIC ACID
STEARYL ALCOHOL
TEREPHTHALYLIDENE DICAMPHOR SULFONIC ACID
TOCOPHEROL
TRIETHANOLAMINE
XANTHAN GUM

Anexo II

Protocolo CEP/FCFRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 016/2016
 kms

Ribeirão Preto, 16 de junho de 2016.

À Pós-graduanda
Gisely Spósito Vieira
 Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho
 Departamento de Ciências Farmacêuticas
 FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE SENSORIAL DESCRITIVA: DESAFIOS ENTRE A METODOLOGIA E A PERCEPÇÃO HUMANA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 388 - CAAE nº 48420815.1.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 153ª Reunião Ordinária realizada em 13/06/2016.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF. DR. CLENI MARA MARZOCCHI MACILAUX
 Coordenadora do CEP/FCFRP