UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação

Tatiana Aparecida Pereira

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

**Orientada**: Tatiana Aparecida Pereira
**Orientador**: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho

Ribeirão Preto
2011

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Tatiana Aparecida
Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: Avaliação de propriedades cosméticas da formulação. Ribeirão Preto, 2011.
102p.; 30 cm.

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

Orientador: Rocha-Filho, Pedro Alves da.

1. Nanoemulsões. 2. EHL. 3. Óleos vegetais. 4. Hidratação da pele. 5. Estabilidade.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Tatiana aparecida Pereira

Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

**Orientador**: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho

Aprovada em:____/____/____

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr. (a):_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr. (a):_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.(a) Dr. (a):_____

Instituição:_____Assinatura:_____

***Dedicatória***

***À meus pais, Izabel e Paulo, todo meu amor por vocês é que me deu forças para alcançar os meus objetivos.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a vida, e a oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus preciosos pais, pelo amor, incentivo e presença constante,

Ao **Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho**, por me acolher, pela confiança depositada e por partilhar seus preciosos ensinamentos.

À todo grupo KOSMOS (**Daniela, Érika, Fernando, Naira, Cindy, Viviane, Talita, Mônica, Carolina, Gysele, Josiane**) pela convivência e por todos os bons momentos que passamos juntos e pela amizade, especialmente a **Naira**, por todo seu auxilio científico, e por partilhar um pouco do seu conhecimento, e **Daniela**, pela amizade, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório, que eu espero que continuem sempre.

Ao **Eduardo (DÚ)** pelo apoio e o auxílio no dia a dia.

À **Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley** da FCFRP por abrir as portas do seu laboratório, e **José Orestes Del Ciampo** por gentilmente colaborar com o desenvolvimento do nosso trabalho.

À **Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca** da FCFRP, por gentilmente colaborar sempre com o nosso grupo, no desenvolvimento de uma etapa do trabalho.

À **Zumira,** minha grande amiga, por todos os momentos que passamos juntas, pelas experiências trocadas, e pelo apoio sempre.

Ás Prof. $^{as}$ Dr.$^{as}$ **Marilisa Guimarâes Lara** e **Lorena Rigo Gaspar Cordeiro** da FCFRP, pela grande contribuição no exame de qualificação.

Às empresas **Lipo do Brasil**, **Pharmaspecial**, **Croda** e **Oxiteno**, que gentilmente cederam as matérias-primas utilizadas no desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, FCFRP-USP, pela oportunidade de aprimoramento profissional.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para o sucesso deste trabalho.

***MUITO OBRIGADA!***

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria acesso ao sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para encontrar a saída."

Mahatma Gandhi

# RESUMO

PEREIRA, T.A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa (*Rubus idaeus*), maracujá (*Passiflora edulis*) e pêssego (*Prunus persica*): avaliação das propriedades hidratantes da formulação.**2011.102f.Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.A pele é constituída por duas camadas: a epiderme e a derme sendo que a camada mais superficial da epiderme, o estrato córneo, camada mais superficial da pele é responsável pela sua função de barreira. Os hidratantes são formulações destinadas a manter o conteúdo de água na pele, uma vez que a hidratação é essencial para manter a função barreira íntegra. Assim, emulsões fluídas e semi-fluídas como as nanoemulsões, que apresentam glóbulos na faixa de 20-200 nm estão sendo amplamente utilizadas como veículos em produtos cosméticos por apresentarem vantagens em relação às macroemulsões, como melhor espalhabilidade e penetração, além de possuírem uma maior estabilidade cinética. O emprego de óleos vegetais como constituintes das nanoemulsões tem sido cada vez mais notório, uma vez que esses óleos são capazes de repor as frações lipídicas da pele hidratando-a. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo obter e caracterizar nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego e avaliar as propriedades cosméticas da formulação. A atividade antioxidante dos óleos foi avaliada por meio do método do $DPPH^{\bullet}$. O EHL da fase oleosa foi então determinado utilizando-se os tensoativos lipofílicos monolaurato de sorbitano e mono-oleato de sorbitano e os tensoativos hidrofílicos polissorbato 20 , polissorbato 80 e PEG 36 castor oil combinados entre si de modo a originar 5 sistemas binários. A nanoemulsão foi obtida pela metodologia EPI (*Emulsion phase inversion*), utilizando-se os tensoativos lipofílicos monooleato de sorbitano e PEG-15 *castor oil* e os tensoativos hidrofílicos PEG-30, PEG-36, PEG-40 e PEG-54 *castor oil* combinados entre si, e as características físico-químicas da nanoemulsão foram determinadas. A nanoemulsão estável e com menor tamanho de glóbulo foi aditivada de (i) lanolina etoxilada e (ii) lanolina acetilada em diferentes concentrações e as alterações nas características físico-quimicas das nanoemulsões foram avaliadas. As nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada e lanolina etoxilada foram submetidas a testes de estabilidade preliminar e acelerada e a avaliação da influência dos derivados de lanolina na hidratação, oleosidade, valor de pH cutâneo e formação de eritema foram avaliados. A mistura dos óleos apresentou maior atividade antioxidante que os óleos separadamente. O EHL requerido para a fase oleosa da emulsão foi igual a 9 e nanoemulsões com menor tamanho de glóbulos foram obtidas com o par de tensoativos monooleato de sorbitano e PEG 36 *castor oil*. A lanolina tanto etoxilada quanto acetilada provocou alterações nas propriedades físico-químicas da nanoemulsão inicial. Frente aos testes de estabilidade, a formulação aditivada de lanolina etoxilada mostrou-se mais estável que a formulação aditivada de lanolina acetilada. As nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina provocaram maior hidratação da pele e aumento da oleosidade quando comparada a nanoemulsão não aditivada, não havendo alteração no valor de pH cutâneo e formação de eritema quando as formulações (tanto aditivadas quanto não aditivada) foram aplicadas.

Palavras chave: nanoemulsões, EHL, óleos vegetais, hidratação da pele, estabilidade.

## ABSTRACT

PEREIRA, T.A. **Preparation and characterization of O/W nanoemulsion composed by raspberry (Rubus idaeus), passionflower (Passiflora edulis) and peach (Prunus persica) oils: evaluation of the cosmetics properties of the formulation.**2011. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The skin consists of two layers: the epidermis and dermis. The most superficial layer of the epidermis, the stratum corneum is responsible for barrier function, so moisturizing formulations are designed to maintain the water content in the skin, since hydration is essential for maintaining the barrier function intact. Thus, fluid and semi-fluid emulsions as the nanoemulsions that present droplets in the range of 20-200 nm are widely used in cosmetics as vehicles because they present advantages over macroemulsões as better spreadability and penetration, and they have greater stability kinetics. The use of vegetable oils as components of the nanoemulsion has been increasingly clear, since these oils are able to replace the lipid fractions of skin moisturizing it, and they have other activities of cosmetic concern. Thus, this study aims to obtain and characterize O/W nanoemulsions composed by raspberry, passion fruit and peach oils and evaluate the cosmetic properties of the formulation. The antioxidant activity of the oils was evaluated by the DPPH $^{\bullet}$ method. The HLB of the oil phase was then determined using the lipophilic surfactants sorbitan monolaurate and sorbitan monooleate and the hydrophilic surfactants polysorbate 20, polysorbate 80 and PEG 36 castor oil combined among themselves in order to create five binary systems. The nanoemulsion was obtained by the methodology *EPI* (*Emulsion phase inversion*), using the lipophilic surfactants sorbitan monooleate, PEG-15 castor oil and hydrophilic surfactants PEG-30, PEG-36, PEG-40 and PEG-54 castor oil combined among themselves, and the physicochemical characteristics of the nanoemulsion was determined. The stable nanoemulsion and with smaller droplet size was additivated (i) ethoxylated lanolin and (ii) acetylated lanolin in different concentrations and changes in physico-chemical properties of nano-emulsions were evaluated. Nanoemulsions were tested for primary and accelerated stability and the influence of derived from lanolin in hydration, skin pH, oily skin and training erythema were evaluated. The mixture of the oils showed higher antioxidant activity than oils separately. The required HLB for the oil phase of emulsion was equal to 9 and nanoemulsion with smaller droplet size were obtained with the pair of surfactants sorbitan monooleate, PEG 36 castor oil. Ethoxylated an acetylated lanolin caused changes in physico-chemical properties of nanoemulsions. The formulation additivated of ethoxylated lanolin was more stable than the formulation additivated of acetylated lanolin front accelerated stability testing. Nanoemulsions additivated of lanolin derivatives caused a higher skin hydration and increase oily skin when compared to the nanoemulsion without additives, with no change in the value of skin pH and erythema formation when the formulations (both with additives and without additives) were applied.
Keywords: nanoemulsion EHL, vegetable oils, skin hydration, stability

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação histológica das camadas da pele (epiderme e derme) e da camada subcutânea a hipoderme..... 5

Figura 2: Camadas da epiderme: diferenciação dos queratinócitos e formação do estrato córneo..... 6

Figura 3: Representação histológica da pele, ilustrando os tipos de pele (pilosa e glabra) e os receptores encontrados na pele. ..... 9

Figura 4: Perda transepidérmica de água através do estrato córneo e por transpiração através das glândulas sudoríparas. 1: perda transepidérmica de água, 2 : transpiração, 3: epiderme, 4: derme.... 14

Figura 5: Esquema das estruturas da pele com função barreira da pele normal e alterada ..... 14

Figura 6: Homogeneizador de alta pressão ..... 17

Figura 7 : Foto ilustrativa das plantas framboesa, maracujá e pêssego..... 20

Figura 8: (**A**) radical difenilpicrilhidrazila e (**B**) molécula difenilpicrilhidrazina ..... 23

Figura 9: Diluição dos óleos para a determinação da atividade antioxidante dos óleos ..... 32

Figura 10: Representação das regiões do antebraço demarcadas para avaliação *in vivo* ..... 38

Figura 11: Princípio de medida do Sebumeter® ..... 39

Figura 12: Representação das coordenadas L*a*b* definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) ..... 40

Figura 13: Função orgânica fenol ..... 43

Figura 14: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de framboesa ao radical DPPH• expressa através do $IC_{50}$ do óleo ..... 44

Figura 15: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de maracujá ao radical DPPH• expressa através do $IC_{50}$ do óleo ..... 45

Figura 16: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de pêssego ao radical DPPH• expressa através do $IC_{50}$ do óleo ..... 45

Figura 17: Medida da atividade doadora de $H^+$ da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1)ao radical DPPH• expressa através do $IC_{50}$ do óleo ..... 46

Figura 18: Tamanho de glóbulo em função da concentração de lanolina etoxilada..... 53

Figura19: Distribuição granulométrica das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina etoxilada..... 54

Figura 20: Índice de polidispersividade em função da concentração de lanolina etoxilada..... 55

Figura 21: Valor de pH em função da concentração de lanolina etoxilada ..... 56

Figura 22: Condutividade elétrica em função da concentração de lanolina etoxilada ..... 56

Figura 23: Tamanho do glóbulo em função da concentração de lanolina acetilada ..... 58

Figura 24: Influência dos derivados de lanolina no tamanho dos glóbulos da nanoemulsão (A) nanoemulsão não aditivada e (B) nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina (etoxilada e acetilada) ..... 59

Figura 25: Distribuição granulométrica das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina acetilada ..... 60

Figura 26: Índice de polidispersividade em função da concentração de lanolina acetilada ..... 61

Figura 27: Condutividade em função da concentração de lanolina acetilada..... 61

Figura 28: Valor de pH em função da concentração de lanolina acetilada ..... 62

Figura 29: Tensão interfacial das nanoemulsões em função da concentração de lanolina etoxilada .. 66

Figura 30: Tensão interfacial das nanoemulsões em função da concentração de lanolina acetilada... 66

Figura 31: Tamanho do glóbulo das nanoemulsões em função do tempo ..... 67

Figura 32: Distribuição granulométrica dos glóbulos das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina etoxilada submetidas à estabilidade acelerada..... 69

Figura 33: Condutividade elétrica das nanoemulsões em função do tempo ..... 70

Figura 34: Valor de pH das nanoemulsões em função do tempo..... 71

Figura 35: Tamanho do glóbulo das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo ..... 72

Figura 36: Distribuição granulométrica dos glóbulos das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina acetilada submetidas à estabilidade acelerada ..... 74

Figura 37: Raio ao cubo em função do tempo das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em diferentes temperaturas de armazenamento..... 75

Figura 38: Condutividade elétrica das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo ..... 76

Figura 39: Valor de pH das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo..... 77

Figura 40: Hidratação relativa do estrato córneo em função do tempo..... 79

Figura 41: Valor de pH cutâneo em função do tempo ..... 80

Figura 42: Oleosidade cutânea em função do tempo..... 81

Figura 43: Avaliação da formação de eritema cutâneo (parâmetro a* em função do tempo)..... 82

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Receptores sensoriais e sensações percebidas por cada um deles..... 8

Tabela 2: Composição química do NMF- *Natural moisturizing factor* ..... 11

Tabela 3: Principais substâncias utilizadas como agentes umectantes e emolientes em formulações cosméticas..... 13

Tabela 4: Concentração do óleo de framboesa, maracujá e pêssego e da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) em cada solvente para a realização do teste de ..... 31

Tabela 5: Concentração final das amostras diluídas no meio reacional ..... 32

Tabela 6: Solubilização dos óleos de framboesa, maracujá , pêssego e da mistura dos óleos ..... 42

Tabela 7: Composição qualitativa e quantitativa dos pares de tensoativos, mantendo constante a concentração de fase oleosa 10,0 % (p/p) e de água purificada 85,0% (p/p) das formulações para a determinação do valor de EHL requerido para a mistura dos óleos ..... 47

Tabela 8: Avaliação macroscópica das formulações após 24 horas de preparo para a determinação do EHL ótimo da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) 48

Tabela 9: Composição qualitativa e quantitativa das formulações mantendo constante a concentração de fase oleosa 10,0 % (p/p) e de água purificada 85,0% (p/p) para a determinação do sistema tensoativo ..... 49

Tabela 10: Análise granulométrica das formulações para a determinação do sistema tensoativo ..... ..... 50

Tabela 11: Comportamento das formulações frente à centrifugação para a determinação do sistema tensoativo ..... 51

Tabela 12: Comportamento das formulações frente ao estresse térmico para determinação do sistema tensoativo ..... 52

Tabela 13: Nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada frente ao teste de centrifugação..... 57

Tabela 14 : Nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada frente ao teste de centrifugação ..... 62

Tabela 15: Composição das formulações para a determinação do EHL ..... 63

Tabela 16:Avaliação macroscópica das nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada após 24 horas de preparo para a determinação do EHL da formulação..... 64

Tabela 17: Avaliação macroscópica das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada após 24 horas de preparo para a determinação do EHL da formulação..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA = Butilhidroxianisol

BHT = Butilhidroxitolueno

CIE= Comissão Internacional de Iluminação

DPPH = 2,2- difenil-1-picril-hidrazil

EHL = Equilíbrio hidrofílico- lipofílico

$EHL_A$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de A

$EHL_B$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de B

$EHL_{resultante}$ = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo resultante

HR = Hidratação Relativa

*INCI = International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

LM = Levemente modificado, não homogêneo

M = Modificado, com separação de fases

Mc = Média da capacitância das leituras da região controle

Mp = Média da capacitância das leituras das áreas de aplicação do produto

NMF = *Natural Moisturizing Factor*

NR = Normal, sem alteração, homogêneo

NS = Não solubilização

O /A = Óleo em Água

OE = Óxido de Etileno

SH = Solubilização homogênea

TEWL= *Transepidermal Water Loss*

$T_{MOS}$ = Monooleato de sorbitano

$T_{MLS}$ = Monolaurato de sorbitano

$T_{15OE}$ = Óleo de rícino 15 OE

$T_{P80}$ = Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano

$T_{P20}$ = Monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE

$T_{30OE}$= Óleo de Rícino 30 OE

$T_{36OE}$ = Óleo de Rícino 36 OE

$T_{40OE}$ = Óleo de Rícino 40 OE

$T_{54OE}$ = Óleo de Rícino 54 OE

**SUMÁRIO**

**RESUMO** ..... i

**ABSTRACT** ..... ii

**LISTA DE FIGURAS** ..... iii

**LISTA DE TABELAS** ..... vii

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS** ..... viii

**1 INTRODUÇÃO** ..... 2

**2 REVISÃO DE LITERATURA** ..... 5

2.1 A pele e a hidratação cutânea ..... 5

2.2 Emulsões. ..... 15

2.3 Óleos vegetais ..... 20

2.3.1 Óleo de Framboesa (*Rubus idaeus*) ..... 20

2.3.2 Óleo de maracujá (*Passiflora edulis*): ..... 21

2.3.3 Óleo de pêssego (*Prunus persica*) ..... 21

2.4 Radicais livres e atividade antioxidante ..... 22

**3 OBJETIVOS** ..... 26

**4 MATERIAL E MÉTODOS** ..... 28

4.1 Material ..... 28

4.1.1 Fase oleosa ..... 28

4.1.2 Fase aquosa ..... 28

4.1.3 Tensoativos ..... 28

4.1.3.1 Tensoativos lipofílicos ..... 28

4.1.3.2 Tensoativos hidrofílicos ..... 29

4.1.4 Aditivos ..... 30

4.1.5 Solventes ..... 30

4.1.6 Conservante ..... 30

4.2 Métodos ..... 31

4.2.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos vegetais .....31

4.2.2. Determinação do valor de EHL requerido.....33

4.2.3 Determinação do sistema tensoativo .....34

4.2.4 Preparo da nanoemulsão .....35

4.2.4.1 Caracterização físico-química das nanoemulsões.....35

4.3 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na formulação .....36

4.3.1 Determinação do EHL das nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina.....36

4.3.2 Determinação da tensão interfacial das nanoemulsões.....36

4.4 Estabilidade preliminar das nanoemulsões .....36

4.5 Estabilidade acelerada das nanoemulsões .....37

4.6 Avaliação *in vivo* da influência das nanoemulsões na hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneos .....37

4.6.1 Avaliação da influência das nanoemulsões na hidratação cutânea.....38

4.6.2 Avaliação da influência das nanoemulsões na oleosidade cutânea .....38

4.6.3 Avaliação da influência das nanoemulsões no valor de pH cutâneo .....39

4.7 Avaliação *in vivo* do potencial irritante das nanoemulsões.....39

4.8 Análise estatística.....40

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** .....42

5.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos vegetais .....42

5.2 Determinação do EHL requerido para a mistura de óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) .....46

5.3 Determinação do sistema tensoativo para a obtenção da nanoemulsão .....49

5.4 Avaliação da influência dos derivados da lanolina nas características físico-químicas da nanoemulsão.....52

5.4.1 Influência da lanolina etoxilada .....52

5.4.2 Influência da lanolina acetilada.....57

5.5 Avaliação da influência dos derivados de lanolina no EHL das nanoemulsões.....63

5.6 Influência dos derivados de lanolina na tensão interfacial das nanoemulsões.....65

5.7 Estabilidade preliminar da formulação aditivada de lanolina etoxilada.....66

5.8 Estabilidade acelerada das formulações aditivadas de lanolina etoxilada .....67

5.9 Estabilidade preliminar das formulações aditivadas de lanolina acetilada .....71

5.10 Estabilidade acelerada das formulações aditivadas de lanolina acetilada .....71

5.11 Avaliação *in vivo* da influência das nanoemulsões na hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneos .....77

5.11.1 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na hidratação cutânea .....77

5.11.2 Avaliação da influência dos derivados de lanolina no pH cutâneo .....79

5.11.3 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na oleosidade cutânea .....80

5.11.4 Avaliação *in vivo* do potencial irritante das nanoemulsões .....81

**6 CONCLUSÃO** .....84

**7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** .....86

**8 APÊNDICES** .....97

**9 ANEXOS** .....102

# *INTRODUÇÃO*

# 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano sendo constituída por duas camadas; a epiderme e a derme e uma camada subcutânea, a hipoderme; desempenhando três funções principais: transmissão de estímulos e sensações, regulação da temperatura corporal e proteção. A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, está diretamente ligada à função barreira da pele, evitando a desidratação excessiva, mantendo a pele hidratada (PAILLER-MATTEI *et al.,* 2007; RIBEIRO, 2010).

Cosméticos hidratantes são formulações complexas, destinados a manter o conteúdo de água na pele entre 10% e 30%, uma vez que a hidratação cutânea é essencial para manter a função barreira íntegra, percebida tatilmente como uma pele suave, macia, delicada.

Emulsões fluídas e semi-fluídas estão sendo amplamente utilizadas como veículo em formulações cosméticas (ECLESTON, 1997) entre as quais destacam-se as nanoemulsões, com tamanho de glóbulos na faixa de 20-200 nm e que se mostram promissoras na ciência cosmética, uma vez que possuem maior estabilidade cinética, melhores propriedades de espalhabilidade, penetração e hidratação quando comparadas às macroemulsões (THADROS *et al.,* 2004).

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de alta ou baixa energia de emulsificação. Os métodos de alta energia recorrem à energia mecânica, através da utilização de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom. Os métodos de baixa energia de emulsificação empregam a energia química armazenada no sistema, podendo ocorrer à temperatura constante, variando-se a composição do sistema- *Phase Inversion Composition* (PIC) ou à composição constante, variando-se a temperatura do sistema (*Phase Inversion Temperature*- PIT) (MORAIS *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais vêm sendo constantemente empregados em formulações cosméticas por apresentarem em sua composição ácidos graxos semelhantes aos existentes na epiderme (LEONARDI, 2004), além de apresentarem atividade antioxidante, auxiliando no processo antienvelhecimento provocado pelos radicais livres. Neste contexto, o óleo de framboesa apresenta constituição rica em ácidos graxos insaturados, sendo os ácidos linolênico, alfa linolênico e oléico, os mais abundantes, além de fonte rica em vitamina E, ácido elágico e polifenóis, o que lhe confere atividade antiinflamatória além da capacidade hidratante. O óleo de maracujá é rico em ácido linoléico, oléico e palmítico, além de ácido ascórbico, beta caroteno e flavonóides e o óleo de pêssego apresenta alto conteúdo de ácido

oléico, ambos atuando na reposição das frações lipídicas da pele (OOMAH, *et al.*, 2000; OLIVEIRA; CEREDA, 2003; KABORI; JORGE,2005) .

Além de óleos vegetais, outros emolientes são amplamente empregados como constituintes de formulações cosméticas, como a lanolina, que é uma substância complexa, formada por uma mistura de ésteres de alcoóis e ácidos graxos, que tem a capacidade de absorver água, proporcionando maior hidratação da pele.

Considerando que, para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos é importante o efeito positivo na hidratação da pele e que o objetivo de um produto cosmético é proteger a pele e retardar o envelhecimento cutâneo, uma série de métodos são utilizados para avaliar a eficácia de novos produtos cosméticos na hidratação cutânea. A hidratação da superfície da pele pode ser mensurada pela medida da capacitância elétrica que envolve a aplicação de uma corrente elétrica à baixa frequência e intensidade no estrato córneo. São realizadas várias medidas comparativas em regiões do corpo com e sem a aplicação do produto cosmético com a finalidade de avaliar o efeito hidratante (MAGDASSI 1997; HARRIS, 2003; WISSING, MULLER, 2003).

Nesta pesquisa, nanoemulsões contendo óleo de framboesa (*Rubus idaeus*), maracujá (*Passiflora edulis*) e pêssego (*Prunus persica*), e aditivada de derivados de lanolina foram desenvolvidas por métodos de baixa energia de emulsificação. As características físico-químicas das formulações foram estudadas, assim como a estabilidade, toxicidade e potencial cosmético.

# REVISÃO DA LITERATURA

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A pele e a hidratação cutânea:

Para melhor entendimento do mecanismo de ação dos hidratantes, faz-se necessário um estudo da estrutura e funções desempenhadas pela pele, ressaltando que um produto cosmético deve ter alta eficácia e baixa toxicidade sistêmica (LEONARDI,2004).

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo uma fronteira ativa que se interpõe entre o organismo e o ambiente, constituindo cerca de 16% do peso corporal. É responsável por funções defensivas e regulatórias como a proteção contra agressões mecânicas, que é medida pela deformação reversível de sua estrutura; a limitação da absorção de substâncias (função barreira); é responsável pela absorção da radiação ultravioleta (UV) e síntese de vitamina D; controle da temperatura e estabilização da pressão sanguínea. No aspecto sensorial, equilibra as sensações de frio, calor, dor; permite a identificação dos indivíduos por suas características peculiares (RIBEIRO,2010).

A análise histológica mostra que a pele é dividida em duas camadas básicas: a epiderme e derme; sendo encontrada logo abaixo da derme uma camada formada por tecido adiposo, a hipoderme, considerada uma camada subcutânea (Figura 1) (PAILLER-MATTEI *et al.,* 2007; RIBEIRO, 2010).

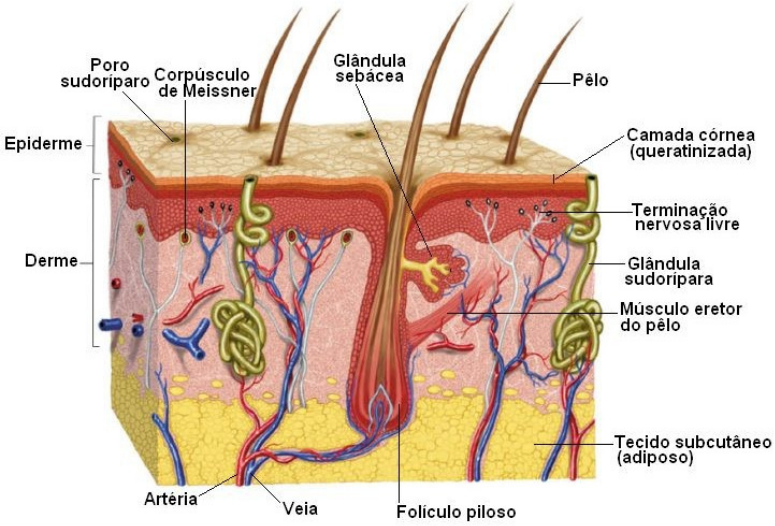



Figura 1: Representação histológica das camadas da pele (epiderme e derme) e da camada subcutânea, a hipoderme.
Fonte: Natura, (2009).

A epiderme consiste de uma estrutura complexa constituída de várias camadas também denominadas estratos (Figura 2), formadas por queratinócitos que são células

epiteliais estratificadas, que sofrem diferenciação à medida que migram da camada basal até a camada mais superficial da pele, quando descamam em várias camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas, chamadas corneócitos. Para que todo esse evento ocorra são necessários aproximadamente 30 dias.

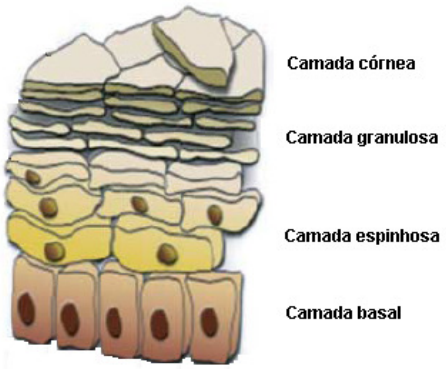



Figura 2: Camadas da epiderme: diferenciação dos queratinócitos e formação do estrato córneo.
Fonte: Verdier-Sévrain; Bonté, (2006).

Desta forma, as camadas da pele são:

- Camada basal: camada mais inferior da epiderme, sendo constituída por células que se dividem continuamente, dando origem às demais que compõem a epiderme. Nesta camada ainda encontram-se os melanócitos, células responsáveis pela síntese de melanina, substância, responsável pela coloração, proteção solar natural, e ainda, as células de Langherans desempenhando papel fundamental no sistema imunológico da pele (RIBEIRO, 2010).
- Camada espinhosa: esta camada situa-se acima da camada basal sendo conhecida também como camada Malphigiana, formada por várias fileiras de células, sendo as mais profundas poliédricas e as mais superficiais achatadas. As células são ligadas entre si por pontes intercelulares denominadas desmossomas (RIBEIRO, 2010).
- Camada granulosa: situa-se entre a camada espinhosa e a córnea, tendo a espessura de duas ou três camadas de células carregadas de grânulos de querato- hialina. Esta região da epiderme é responsável pela formação da bicamada de lipídios presente entre as fileiras de células corneificadas que formam a camada córnea tendo como função, prevenir a desidratação das camadas subjacentes da epiderme, formar barreira e oferecer resistência à absorção percutânea, atuando também como cimento ao fixar as células queratinizadas umas às outras, impedindo assim o desprendimento das mesmas (RIBEIRO, 2010).

- Camada lúcida: presente na palma das mãos e planta dos pés conferindo maior espessamento da pele nessas regiões (RIBEIRO, 2010)
- Camada córnea: é a camada superior da epiderme, sendo resultado final do processo de diferenciação celular pelo qual passam os queratinócitos. Os corneócitos, células que formam esta camada, são células anucleadas, poligonais e planas. Na parte mais superficial da camada córnea encontra-se o *stratum disjunction*, ou desprendível, em processo contínuo de descamação. Em situações normais, é substituído por outras novas camadas de células provenientes de camadas mais profundas, o *stratum* compacto, sendo este mais compactado, mais espesso e de aspecto mais regular com maior hidratação e células unidas umas as outras por desmossomos. Nesta região a atividade enzimática é intensa, diminuindo a coesão dos corneócitos, facilitando a migração para o *stratum disjunction* (RIBEIRO, 2010).

A derme consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente às agressões mecânicas, fornece nutrientes à epiderme e abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos. A derme, constituída por fibras de colágeno e elastina, é dividida em duas partes: a derme papilar que se encontra em contato direto com a epiderme e a derme reticular, localizada abaixo da derme papilar. As fibras colágenas conferem maior resistência à pele, formando uma rede que sustenta outras estruturas como pêlos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas. As fibras elásticas permitem a deformação da pele, que retorna ao estado original quando suspensa a tensão aplicada (RIBEIRO, 2010).

Os apêndices cutâneos se dividem em:

- Glândulas sudoríparas: se dividem em apócrinas e écrinas. As apócrinas que são tubulares e conectadas ao folículo piloso, encontrando-se presentes principalmente nas axilas, região anogenital, canal auditivo externo e pálpebras secretando sob estímulo hormonal material viscoso, leitoso e inodoro. As écrinas estão distribuídas praticamente em todo o corpo, mas principalmente na palma das mãos, sola dos pés, fronte e axilas, sendo controladas pelo sistema nervoso colinérgico, e secretam o suor, inodoro, rico em água, sais minerais e pobre em material orgânico (RIBEIRO,2010).
- Glândulas sebáceas: estas glândulas são holócrinas e associadas ao folículo piloso exceto nas regiões dos lábios, mamilos e auréolas. Estão distribuídas em grande proporção no couro cabeludo, face, tórax e ombros, estando ausentes na palma das mãos e planta dos pés. A secreção sebácea é composta por triglicerídeos, ceras, esqualeno, ácidos graxos e ésteres de colesterol, com a função de barreira hidrorepelente (RIBEIRO, 2010).

- Folículos pilosos: consistem em uma invaginação da epiderme formando um bulbo capilar de onde se originam os pêlos e os cabelos.

Os vasos sanguíneos nutrem e regulam a temperatura corporal através da alternação contínua de mecanismos de vasodilatação e vasoconstrição dos capilares em função da situação ambiental (RIBEIRO,2010).

As sensações tais como alteração na temperatura e pressão, tato e dor são detectados por nervos específicos presentes na derme (Tabela 1), que recebem a todo instante, diversos tipos de estímulos do ambiente transmitindo- os ao cérebro, onde serão traduzidos em sensações.

Tabela 1: Receptores sensoriais e respectivas funções.

| RECEPTORES DE SUPERFÍCIE | SENSAÇÃO PERCEBIDA |
|---|---|
| Receptores de Krause | Diminuição da temperatura |
| Receptores de Ruffini | Aumento da temperatura |
| Discos de Merkel | Tato e pressão |
| Receptores de Vater-Pacini | Pressão forte |
| Receptores de Meissner | Tato |
| Terminações nervosas livres | Principalmente dor |

Fonte: Bears, (2002); Ribeiro, (2010).

A hipoderme, camada subepidérmica é formada por células preenchidas por material graxo, tendo espessura bastante variável. Esta camada apóia e une a epiderme e a derme ao restante do corpo e permite que as duas primeiras camadas deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo. Além disso, a hipoderme mantém a temperatura corporal, acumula energia para o desempenho das funções biológicas, protege o organismo contra agressões mecânicas e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes.

A espessura da pele varia de acordo com a área do corpo, etnia, idade e hidratação. A espessura da epiderme está entre 40 μm e 80 μm, a espessura da derme é maior que 800 μm e menor que 1500 μm e a da hipoderme é dependente da zona do corpo e dieta alimentar. Em geral, a pele mais espessa encontra-se em regiões sujeitas a pressões e atritos constantes. A pele pode ainda ser classificada como pilosa, revestindo a maior parte do corpo ou, glabra,

que reveste a palma das mãos e a planta dos pés e também,a orificial, entre a pele pilosa e as mucosas (PAILLER-MATTEI *et al*., 2007; RIBEIRO, 2010).

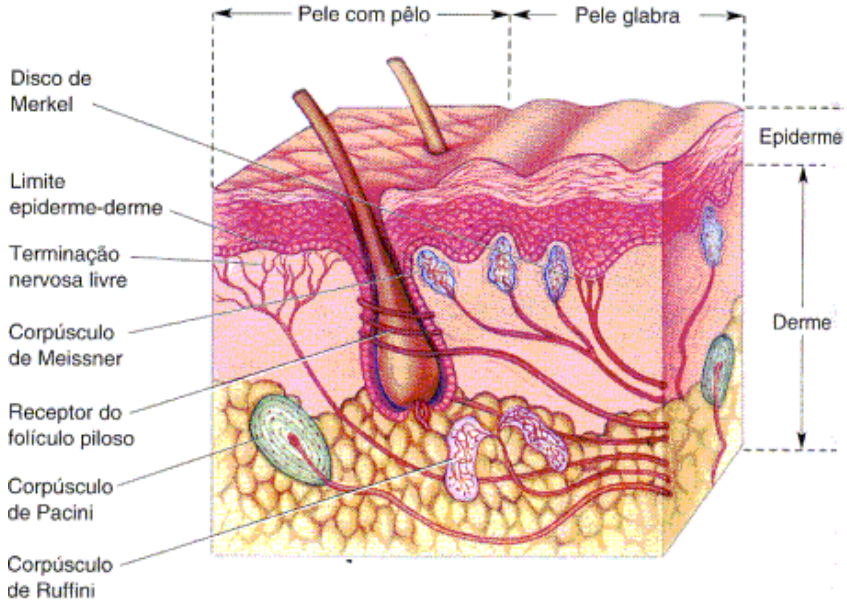



Figura 3: Representação histológica da pele, ilustrando os tipos de pele (pilosa e glabra) e os receptores encontrados na pele.
Fonte: BEARS, M.F; CONNORS, B.W; PARADISO, M.A. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre 2ª ed. Artmed Editora, 2002.

A função barreira da pele, sendo talvez a mais importante função desempenhada por este órgão, reside quase inteiramente na epiderme e, em particular, na camada mais superficial: o estrato córneo (DALENSKI *et al*., 2009).

O estrato córneo (espessura média de 10 µm-20 µm) é a camada mais externa da epiderme e consequentemente da pele, atuando como barreira para proteger o corpo de fatores nocivos, limitar a perda de água para o ambiente externo e prevenir a entrada de microorganismos ou substâncias químicas. Os corneócitos (células queratinizadas) presentes na camada córnea são envolvidos por uma matriz lipídica intercelular resultando em uma "estrutura morta" (PAILLER-MATTEI *et al*., 2007).

As funções vitais do estrato córneo são fortemente dependentes do seu conteúdo aquoso e desta forma, a integridade do mesmo é fundamental para a hidratação da pele e para a manutenção de uma pele saudável. Para que a pele desempenhe todas as suas funções, é necessário que haja um equilíbrio do conteúdo aquoso no estrato córneo e a eudermia – condições de normalidade da pele - seja mantida, sendo este, o objetivo das formulações

cosméticas (VERDIER-SÉRVRAAIN, BONTÉ; 2006; JOHNSEN, MARTINSEN, GRIMNES; 2009).

A habilidade do estrato córneo em reter água está relacionada à presença de compostos higroscópicos no interior dos corneócitos (*Natural Moisturizing Factor*- NMF) e a presença de lipídios extracelulares ordenadamente arranjados para formar a barreira contra a perda transepidérmica de água (*TransEpidermal Water Loss* TEWL). O NMF é composto por aminoácidos livres e seus derivados (Tabela 2), estando presente em altas concentrações, representando cerca de 20-30% do peso do estrato córneo seco. Por absorver água da atmosfera e incorpora- la ao conteúdo aquoso natural, os componentes do NMF agem como eficientes humectantes (RAWLINGS, HARDING; 2004).

Tabela 2: Composição química do *Natural Moisturizing Factor* (NMF).

| Componentes do NMF | Composição (%) |
|---|---|
| Aminoácidos livres | 40 |
| Ácido pirrolidono-carboxílico (PCA) | 12 |
| Lactato | 12 |
| Açúcares | 8,5 |
| Ureia | 7 |
| Cloreto | 6 |
| Sódio | 5 |
| Potássio | 4 |
| Amônia , ácido úrico, glicosamina e creatina | 1,5 |
| Cálcio | 1,5 |
| Magnésio | 1,5 |
| Fosfato | 0,5 |
| Citrato | 0,5 |

Fonte: Rawlings, Rarding; (2004).

Os componentes do NMF podem ser facilmente removidos da superfície da pele por agentes de limpeza e fatores como baixa umidade, exposição à radiação violeta e idade, causando declínio da função barreira (RAWLINGS, HARDING; 2004; VERDIER-SÉRVRAAIN, BONTÉ; 2006).

Na superfície da pele está presente um filme lipídico, formado por material graxo - mistura de ceramidas, colesterol e ácidos graxos, adicionado de pequenas quantidades de sulfato de colesterol, glucosil ceramidas e fosfolipídios - excretado pelas glândulas sebáceas, juntamente a componentes excretados no suor, resultando em uma emulsão epicutânea que é responsável pela proteção da pele contra o ressecamento, manutenção da flexibilidade e auxiliar na formação da barreira acídica que protege nosso organismo contra a penetração de agentes externos. Este filme pode ser alterado por fatores fisiológicos, como mecanismo de controle da temperatura corporal, ciclo circadiano e fatores ambientais, como umidade relativa do ar, sendo que, quanto menor a umidade maior a perda de água através da pele. Outras condições são: estilo de vida, hábitos alimentares, tabagismo, álcool, estresse e uso de medicamentos e cosméticos (PETERSEN, 1992; SUMMERS *et al*., 1996; LEOW, MAIBACH , 1998; VERDIER-SEVRAIN, BONTÉ, 2007) .

Diversos fatores alteram a integridade da barreira cutânea resultando em desidratação da pele. Tais fatores são: alterações no estrato córneo, anormalidades no processo de queratinização e diminuição do conteúdo hídrico do estrato córneo abaixo de 10%, sendo causado pelo desequilíbrio entre a perda de água e respectiva reposição pelas camadas inferiores, alteração do filme hidrolipídico e nos lipídios intercelulares e alterações no pH cutâneo (PONS-GUIRAUD, 2007).

Fatores ambientais como temperatura corporal, uso de produtos tópicos e alguns fatores endógenos podem alterar a membrana dos corneócitos, acarretando diminuição da composição e função do NMF,e de outras proteínas responsáveis pela manutenção da hidratação resultando em desidratação da pele (HARRIS, 2003).

Desta forma, para manutenção de suas funções a hidratação torna-se indispensável, sendo que a pele adequadamente umectada melhora o aspecto geral e retarda o envelhecimento. Neste contexto, os hidratantes são produtos utilizados com a finalidade de manter o estrato córneo hidratado (JOHNSEN, MARTINSEN, GRIMNES; 2009).

Cosméticos hidratantes são formulações complexas, destinados a manter o conteúdo de água na pele entre 10% e 30%, uma vez que a hidratação cutânea é essencial para manter a função barreira íntegra, percebida tatilmente como suave, macia, delicada. Desta forma, hidratação refere-se à diminuição da perda transepidérmica de água após a aplicação do produto hidratante. Assim, a função dos cosméticos hidratantes é minimizar os efeitos resultantes da perda dos lipídios epidermais da barreira da pele, através da ação de agentes umectantes e emolientes, integrantes da composição dos hidratantes (DRAELOS, 2000; FLYNN *et. al.*, 2001).

Os agentes umectantes têm como função atrair água da derme e das camadas mais profundas da epiderme viável para o estrato córneo. Em condições de umidade relativa do ar superior a 70% estas substâncias são também capazes de atrair água do ambiente. Os emolientes são substâncias capazes de prevenir a perda transepidérmica de água através da ação oclusiva. Estas substâncias oleosas formam uma fina camada sobre a pele, o que enriquecem a ação do manto hidrolipídico e retardam a evaporação da água, sendo que uma formulação hidratante adequada é aquela que associa substâncias umectantes e emolientes (Tabela 3) (DRAELOS, 2000; FLYNN *et. al.*, 2001).

Tabela 3: Principais substâncias utilizadas como agentes umectantes e emolientes em formulações cosméticas.

| Umectantes | Emolientes |
|---|---|
| Uréia | Derivados minerais |
| Ácido pirrolidona carboxílico sódico (PCA-Na) | Gorduras animais |
| Ácido lático | Manteigas vegetais |
| Glicerina | Silicone |
| Pantenol | Óleos vegetais |
| Sorbitol | Ceras |
| Propilenoglicol | Álcoois graxos |
| Ácido hialurônico | Ácidos graxos |
| Algumas vitaminas | Álcool |
| Algumas proteínas | _ |

Fonte: Flynn *et al.* , (2001).

As substâncias intracelulares higroscópicas, como os constituintes do NMF (sais de alfa-hidróxiácidos, ácido pirrolidona carboxílico sódico (PCA- Na), uréia, seguidos por outros de menor eficácia) têm a capacidade de promover hidratação ativa por meio da reposição desses componentes na pele. Esses ativos podem permear a camada córnea, retendo água em toda a extensão da mesma (RIBEIRO,2010).

Uma vez que a quantidade de água presente na epiderme está relacionada às condições e propriedades, a perda transepidérmica de água é uma maneira de se avaliar a função barreira da pele. Desta forma, a perda transepidérmica de água é a perda total de água da epiderme viável e derme, por difusão através do estrato córneo e originada das glândulas sudoríparas (Figura 4).

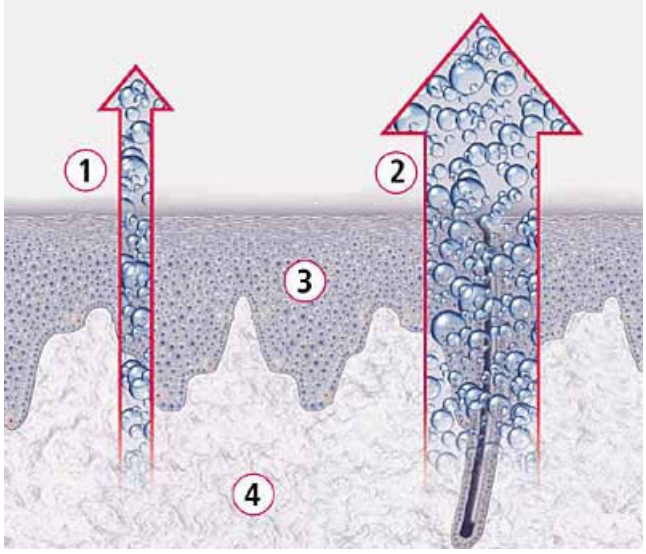
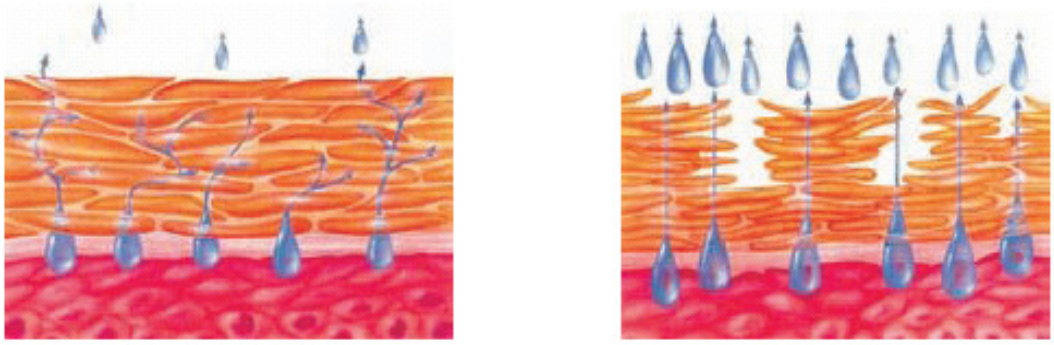



Figura 4: Perda transepidérmica de água através do estrato córneo e por transpiração através das glândulas sudoríparas. 1: perda transepidérmica de água, 2 : transpiração, 3: epiderme, 4: derme.
Fonte: Eucerin, (2010).

Assim, a perda transepidérmica de água tem sido uma ferramenta de estudo para avaliar os efeitos que o meio ambiente, temperatura, algumas doenças e formulações cosméticas, exercem na troca de água da pele com o ambiente. Assim, se a função da pele está danificada, haverá aumento na perda de água, por outro lado, a integridade da função barreira acarretará em maior conteúdo aquoso no estrato córneo (Figura 5) (ROSSI, VERGNANINI, 1997; HADGRAFT, 2001; VERDIER-SEVRAIN, BONTÉ, 2007).



Função barreira normal.
Equilíbrio da TEWL (perda transepidermal de água).

Função barreira alterada.
Aumento da TEWL.

Figura 5: Esquema das estruturas da pele com função barreira da pele normal e alterada.
Fonte: Via Farma, (2008).

Alguns fatores influenciam a perda transepidérmica de água, como o processo natural de envelhecimento da pele, onde ocorre diminuição da perda transepidérmica de água,

em função do decréscimo do conteúdo aquoso do estrato córneo e a realização de trocas gasosas entre a pele e o ambiente (difusão de oxigênio e dióxido de carbono) (HADGRAFT, 2001; MILAN *et al.,* 2007).

Em relação ao estudo de formulações cosméticas, a avaliação da perda transepidérmica de água auxilia na elucidação do mecanismo de ação de cada formulação, pois, nem todos os produtos referidos como hidratantes atuam retendo água na pele devido às características higroscópicas e sim através da criação de uma barreira superficial (GONÇALVES, MAIA CAMPOS;2004; CAMPOS *et al*., 2008 ).

A hidratação da superfície da pele pode ser mensurada pela medida da capacitância elétrica envolvendo a aplicação de uma corrente elétrica à baixa freqüência e intensidade, de modo que esta corrente atinja o estrato córneo. São realizadas várias medidas comparativas em regiões com e sem o produto cosmético a fim de avaliar o efeito hidratante do produto sobre a pele (HARRIS, 2003).

Em se tratando de produtos cosméticos, a medida da hidratação da pele é a mais empregada uma vez que o apelo mais desejado para os produtos hidratantes é o combate à desidratação e prevenção do envelhecimento cutâneo (BAREL, CLARYS, GABARD; 1999).

Tendo em vista que para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos é importante considerar seu efeito positivo na hidratação e, considerando que o objetivo de um produto cosmético é proteger e retardar o envelhecimento cutâneo, um dos veículos amplamente utilizados em produtos cosméticos está representado pelas emulsões fluídas e semi-sólidas (ECLESTON, 1997; MAGDASSI 1997;WISSING, MULLER, 2003).

## 2.2 Emulsões:

Emulsão pode ser definida como um sistema termodinamicamente instável, composto por dois líquidos imiscíveis, no qual um está disperso no outro na forma de glóbulos. De acordo com a hidrofilia ou lipofilia da fase dispersante, esses sistemas classificam-se em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela ação de agentes tensoativos, que são substâncias capazes de diminuir a tensão interfacial do sistema e formar um filme, ao redor dos glóbulos da fase dispersa, com propriedades estéricas e eletrostáticas, estabilizando o sistema. Os tensoativos são moléculas anfifílicas que se adsorvem na interface entre a fase dispersa e dispersante, tendo a dupla função de reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema prevenindo fenômenos de instabilidade que poderão causar a separação das fases do sistema.

Os principais fenômenos de instabilidade observados em emulsões são floculação, cremeação e coalescência (SCHULLER, ROMANOWSKI, 1998).

A floculação é um fenômeno que pode ser definido como uma adesão mútua dos glóbulos da fase dispersa, formando uma rede tridimensional, porém, os glóbulos permanecem com a estrutura do filme interfacial inalterado, e uma simples agitação pode reverter o processo. O processo de cremeação ocorre quando há diferença entre as densidades da fase dispersa e dispersante da emulsão, provocando a separação das fases. Quando a fase dispersa é menos densa do que a fase dispersante, os glóbulos da emulsão formarão um creme na região superior da amostra, o inverso ocorre quando a fase dispersante é menos densa que a fase dispersa, este processo de instabilidade é reversível, por simples agitação do sistema. A coalescência é um processo irreversível e, ocorre quando dois glóbulos alcançam proximidade suficiente, têm a estrutura de suas interfaces comprometidas e, perdem a individualidade tornando-se um único glóbulo (SCHULLER; ROMANOWSKI, 1998; MORRISON; ROSS, 2002).

Dependendo do tamanho do glóbulo, emulsões podem ser classificadas em microemulsões, mini (nanoemulsões) e macroemulsões (ZANIN *et al.,* 2002; JAFARI *et al*., 2008).

Nanoemulsões são emulsões finas, nas quais o tamanho dos glóbulos varia de 20 a 200nm. Devido ao pequeno tamanho de partículas, apresentam-se macroscopicamente transparentes ou translúcidas. Alguns aspectos físico-químicos desses sistemas coloidais são determinantes para a estabilidade, que se mostra superior aos sistemas macroemulsionados. Nanoemulsões são cineticamente estáveis, frente: à floculação, devido à estabilidade estérica proporcionada pelos tensoativos; à cremeação e sedimentação, uma vez que pequeno tamanho de glóbulos permite que o movimento Browniano ou taxa de difusão supere os fenômenos de sedimentação e cremeação induzidos pela força da gravidade (SOLANS *et al.,* 2005). A granulometria também é responsável por prevenir a coalescência do sistema devido à deformabilidade dos glóbulos e a espessura do filme interfacial de tensoativos que previne qualquer diminuição e rompimento do filme dos glóbulos dispersos (CAPEK, 2004). Nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que não podem ser formados espontaneamente, e necessitam de energia para a formação do sistema. Podem ser formadas por processos de alta energia de emulsificação (dispersão) que faz uso da energia mecânica, ou mecanismos de baixa energia de emulsificação (condensação) que fazem uso da energia química armazenada no sistema. Nos métodos de alta energia de emulsificação esta é alcançada através de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom, para

promover o cisalhamento capaz de deformar a partícula (Figura 6). A aplicação de alta energia gera forças que podem romper as gotas da fase dispersa, de forma que a diferença entre as pressões, interna e externa, da gota seja superada (Lei de Young-Laplace).

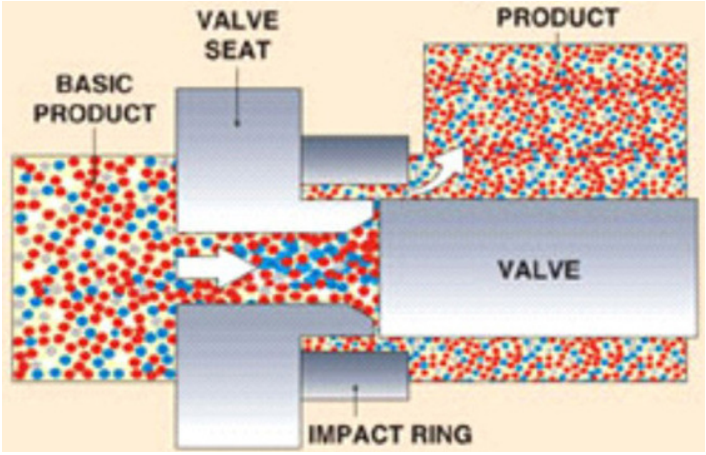



Figura 6: Homogeneizador de alta pressão.
Fonte: Simranseals, 2010.

Esses métodos são utilizados para operações industriais, apresentando controle sobre tamanho e distribuição dos glóbulos, sendo capazes de produzir emulsões finas (THADROS *et al.,* 2004, KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010).

Métodos de baixa energia de emulsificação exploram a transição de fases que ocorre durante o processo de emulsificação. A emulsificação pode ocorrer à temperatura constante, variando-se a composição (PIC), ou então, mantendo- se constante a composição e variando-se a temperatura do sistema (PIT). O método da temperatura de inversão de fases (PIT) está baseado na mudança da solubilidade dos tensoativos não iônicos com a mudança da temperatura. Um tensoativo que é hidrofílico em valores de baixa temperatura, torna-se lipofílico com o aumento da mesma devido à desidratação das cadeias de óxido de etileno. Em valores baixos de temperatura, a molécula do tensoativo possui curvatura positiva, formando emulsões O/A, ocorrendo o inverso em altos valores de temperatura, onde a curvatura do tensoativo é negativa, originando emulsões do tipo A/O. No valor de temperatura do EHL, a curvatura é igual a zero, e uma emulsão bicontínua é formada. Nesta temperatura, a tensão interfacial do sistema é mínima, favorecendo a emulsificação espontânea do sistema. Contudo, neste valor de temperatura, a taxa de coalescência é extremamente rápida e as emulsões são muito instáveis. Com rápido resfriamento ou aquecimento das emulsões formadas na temperatura do EHL, emulsões cineticamente estáveis e com baixo índice de polidispersividade podem ser formadas. Este método tem como inconvenientes a necessidade

de uso de agentes tensoativos e co-tensoativos em combinação e não é ideal para ser usado em larga escala ( ZANIN *et al.,* 2002; SOLANS *et al.,* 2005; EE *et al.,* 2008). As vantagens das nanoemulsões como produtos cosméticos são:

- devido ao tamanho das partículas, podem cobrir extensa área cutânea sendo indicados como sistemas para liberação de ativos na pele; podem penetrar através da superfície áspera de peles ressecadas (THADROS *et al.,* 2004);
- diâmetro muito pequeno das partículas permite a deposição uniforme nos substratos. A molhabilidade, espalhabilidade e penetração podem ser aumentadas como resultado da baixa tensão superficial do sistema e da baixa tensão interfacial das gotículas O/A (THADROS *et al.,*2004);
- aspectos físicos (transparência e fluidez) e ausência de espessantes podem garantir excelente aspecto estético e sensorial na pele (THADROS *et al.,*2004);
- ao contrário de microemulsões, exigem quantidades não excessivas de tensoativos, na faixa de 5 a 10% (THADROS *et al.,* 2004);
- podem ser substitutas de lipossomas e vesículas que são menos estáveis, permitindo em alguns casos a formação de fases cristalinas lamelares ao redor das gotículas da nanoemulsão (THADROS *et al.,*2004).

*Ostwald ripening* é o principal mecanismo de desestabilização de nanoemulsões uma vez que a cremeação é prevenida pelo efeito Browniano que é capaz de superar a força de separação gravitacional e a floculação, pela estabilização estérica proporcionada pelas moléculas do tensoativo. *Ostwald ripening* é o transporte de óleo a partir de pequenos glóbulos para grandes glóbulos através da fase contínua. Ocorre primariamente, via tendência à dissolução molecular do óleo na fase contínua sendo direcionado pela dependência da solubilidade dos glóbulos da emulsão com seu tamanho. Este efeito surge a partir da diferença no potencial químico entre pequenos e grandes glóbulos da emulsão como resultado da diferença da pressão de Laplace. Somente uma pequena diferença no tamanho dos glóbulos é necessária para criar um gradiente de potencial químico suficientemente grande para iniciar *Ostwald ripening*. Portanto, uma inicial diferença no tamanho, torna-se cada vez mais acentuada com o progresso de *Ostwald ripening*. Higuchi, Misra (1962) foram os primeiros a propor que *Ostwald ripening* de emulsões poderia ser retardado pela incorporação de um segundo óleo com uma menor solubilidade na fase contínua. Este conceito está baseado na premissa de que a entropia da mistura fornece um potencial químico oposto ao *Ostwald ripening*. Quando uma mistura de óleos está sob a ação de *Ostwald ripening*, o óleo solúvel

tem maior mobilidade entre os glóbulos. Ao longo do tempo, os glóbulos grandes tornam-se enriquecidos com o óleo solúvel e os glóbulos pequenos tornam-se enriquecidos com o óleo insolúvel. Isto cria um desequilibro composicional, que é de entropia maior que um sistema igualmente misturado, e desta forma, *Ostwald ripening* pode ser retardado (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008). A taxa de *Ostwald ripening* pode ser calculada segundo teoria de Lifshitz- Slezov e Wagner chamada de LSW teoria (Equação 1).

Equação 1:

$$\omega = dr^3 / dt$$

**Ou**

$$\omega = 8/9\ [C\infty\gamma Vm\ D) / \rho RT]$$

onde:

w = Índice de *Ostwald ripening*

$r^3$ = raio ao cubo

t = tempo

C∞= solubilidade da fase contínua

γ = tensão interfacial

*Vm* = volume molar da fase dispersa

D = coeficiente de difusão da fase dispersa

ρ = densidade do óleo

*R* = constante dos gases

*T* = temperatura absoluta

Conseqüentemente, Ostwald ripening é dado pela relação linear entre o raio ao cubo pelo tempo (THADROS et al., 2004).

Desta forma, para que emulsões estáveis sejam produzidas, é necessário que se utilize como fase oleosa óleos que apresentem baixa solubilidade na fase contínua.

2.3 Óleos vegetais:

O estrato córneo contém naturalmente substâncias emolientes como ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol. Os óleos vegetais vêm sendo constantemente empregados em formulações cosméticas de uso tópico por apresentarem em sua composição, ácidos graxos semelhantes àqueles da epiderme (LEONARDI, 2004). No presente estudo, os óleos vegetais utilizados foram de framboesa, maracujá e pêssego (Figura 7).

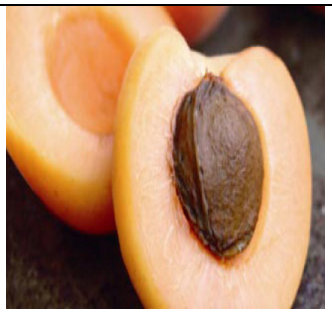
| | | |
|---|---|---|
| | |  |
| Planta framboesa (*Rubus idaeus*) | Fruto e sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) | Fruto e amêndoa de pêssego (*Prunus persica*) |

Figura 7: Foto ilustrativa das plantas framboesa, maracujá e pêssego.
Fonte: Pharmaderm, (2010); Naturaekos, (2010); Natura, (2008) respectivamente.

### 2.3.1 Óleo de Framboesa (*Rubus idaeus*):

A framboesa (*Rubus idaeus*) (Figura 7) é um alimento popular pelo seu sabor, conteúdo nutricional e seus efeitos significantes na saúde (KLESK; QIAN; MARTIN, 2004). É importante fonte de gama tocoferol, substância antioxidante, importante na prevenção de doenças degenerativas; de antocianinas, composto pertencente à classe dos flavonóides, com efeito antioxidante e anti-inflamatório inibindo a síntese de ciclooxigenase 1 e 2; e de fenóis, responsáveis também pela atividade antioxidante do óleo. A atividade antiinflamatória do óleo de framboesa é superior à de outros óleos conhecidos como de abacate, uva, avelã e gérmem de trigo (OOMAH *et al*., 2000; WADA; OU, 2002; HASSIMOTTO *et al.,* 2008). Possui fator de proteção solar em torno de 25 a 50, sendo também rica fonte de vitamina E, e ácido elágico, poli fenol com atividade anticarcinogênica e mutagênica (KLESK; QIAN; MARTIN, 2004). O óleo é obtido através da prensagem a frio das sementes contendo de 11 a 23% de óleo, apresentando-se como líquido cristalino e brilhante, de cor amarelo a laranja, com odor característico. É rico em ácidos graxos insaturados sendo o ácido linoléico (ômega 6), alfa linolênico (ômega 3) e oléico (ômega 9) os mais abundantes, correspondendo a 96 % da quantidade total de ácidos graxos do óleo (OOMAH *et al.,* 2000 ; LIPO DO BRASIL, 2009). Esses ácidos graxos essenciais são conhecidos pela importante propriedade de barreira, e possuem excelente penetração na pele.

2.3.2 Óleo de maracujá (*Passiflora edulis*):

O maracujá (Figura 7), fruto do maracujazeiro, é uma planta originária da América tropical, sendo muito cultivada no Brasil. É uma planta trepadeira, da família *Passiflorácea*. As espécies mais comuns são *Passiflora edulis* e *Passiflora incarnata.* A maior importância econômica do maracujá está na produção do suco industrializado. Durante este processo de industrialização, as cascas e as sementes que são resíduos industriais provenientes da divisão da fruta e representam grande parte do fruto são descartados, sendo desta forma, importante do ponto de vista econômico, cientifico e tecnológico agregar valor a estes subprodutos. As sementes no maracujá representam de 6 a 12 % do peso total do fruto, sendo uma boa fonte de óleo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). O óleo das sementes de maracujá possui coloração amarela, odor suave, sabor agradável, sendo rico em ácido linoléico, oléico e palmítico (KOBORI; JORGE, 2005). Para obtenção do óleo, as sementes são prensadas a frio e contem aproximadamente 3% de óleo. O óleo de maracujá possui também ácido ascórbico, beta caroteno, flavonóides, cálcio, fósforo e potássio (BERACA SABARÁ, 2010). O óleo é também composto pela passiflorina, uma substância relaxante, com aroma que reduz a ansiedade, melhora o sono e diminui o estresse em geral, sendo bom hidratante, uma vez que repõe as frações de ácidos, linoléico e oléico, presentes na superfície da pele, e que são facilmente removíveis por sabões, sendo desta forma, importante a restauração dos mesmos na camada lipídica da pele (GERBRAS MAGISTRAL, 2010).

2.3.3 Óleo de pêssego (*Prunus persica*):

O pessegueiro (*Prunus persica*) (Figura 7) é uma planta da família das Rosáceas, originária da Ásia. O pêssego é utilizado principalmente como matéria prima para a produção de doces em calda e suco. O caroço, resíduo do processamento pode ser aproveitado para extração do óleo. A importância do óleo de amêndoa de pêssego está diretamente relacionada com à composição rica em ácidos graxos, sendo de baixo conteúdo em ácidos graxos saturados, alto conteúdo de ácido oléico (55-77%) e com a presença de ácidos essenciais. Assim, torna- se muito atrativo em termos nutricionais, possuindo importantes propriedades terapêuticas, sendo utilizado tanto em medicamentos de uso tópico como em cosméticos. O óleo de pêssego possui excelente penetrabilidade, é um excelente lubrificante, rico em vitamina E, tornando-se uma ótima escolha para peles desidratadas (CALGAROTO *et al.,* ; OLIVEIRA; CEREDA, 2003; PHARMASPECIAL, 2010).

A utilização dos óleos vegetais em formulações cosméticas é de grande importância, pois são substâncias emolientes que além de repor as frações lipídicas da pele, hidratando-a, possuem em sua composição substâncias que lhes confere outras atividades, como por exemplo, atividade antioxidante.

2.4 Radicais livres e atividade antioxidante:

Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação de átomos que possuem um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa, o que implica em alta instabilidade, energética e cinética, conferindo alta reatividade a esses átomos de modo que para manterem- se estáveis precisam ganhar ou doar um elétron de outra molécula. Esses radicais livres são derivados muitas vezes do metabolismo do oxigênio, sendo comumente denominados como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, processo no qual iniciarão uma série de reações originando alterações em proteínas extracelulares e modificações celulares, sendo que o maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos presentes na dupla camada lipídica das células causando a morte celular. O organismo possui dois sistemas capazes de proteger as células dos danos causados pelos radicais livres- estresse oxidativo: (i) sistema enzimático e (ii) sistema não-enzimático. O sistema enzimático constitui-se da enzima superóxido dismutase (SOD) junto com a catalase e glutationa peroxidase, que detoxificam os radicais, peróxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. O grupo dos antioxidantes naturais não enzimáticos inclui os carotenóides, vitamina C hidrossolúvel (ácido ascórbico), vitamina E lipossolúvel, (α-tocoferol), ubiquinol-10 (coenzima $Q_{10}$) e outras substâncias como cisteína, ácido úrico e glutationa. Muitos antioxidantes não enzimáticos(α-tocoferol, ubiquinona, glutationa, ascorbato e urato) estão presentes em altas concentrações na epiderme, porém, se a produção de radicais livres for excessiva, a concentração desses antioxidantes pode decair com aumento na formação de componentes celulares oxidados. A eficiência desses sistemas também tende a decair com a idade, sendo necessário o uso de compostos exógenos para reforçar o sistema de defesa contra os radicais livres, em adição à medidas, químicas e físicas, de proteção contra a radiação UV, uma vez que a mesma causa a formação de radicais livres (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

Recentemente, compostos químicos com atividade antioxidante presentes em vegetais têm atraído grande atenção devido ao seu papel na prevenção de doenças causadas como resultado do estresse oxidativo, devido à baixa toxicidade em relação a antioxidantes

sintéticos. Acredita-se que a ingestão de substâncias antioxidantes através do consumo de plantas possa prevenir doenças degenerativas, devido à atividade anti radicais livres, pois hoje é bem estabelecido que os radicais livres contribuem para a origem de várias doenças como aterogênese, inflamação crônica, neurodegeneração e câncer. A mesma atenção tem sido dada ao desenvolvimento de antioxidantes naturais obtidos através de fontes botânicas, para o uso em formulações cosméticas anti- *ageing,* uma vez que sabe-se que os radicais livres estão relacionados ao processo de envelhecimento cutâneo (DENG; CHENG; YANG, 2011; LÓPEZ et al., 2011).

Junto com desenvolvimento de novos antioxidantes, existe aumento no uso de métodos rápidos, fáceis de realizar, altamente reprodutíveis e de baixo custo, capazes de mensurar a concentração de antioxidantes em determinados materiais.

O método do DPPH$^{\bullet}$ é amplamente utilizado na quantificação da atividade antioxidante apresentada por determinadas plantas (DENG; CHENG; YANG, 2011). O radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila- DPPH$^{\bullet}$, é caracterizado como um radical estável devido ao deslocamento de um elétron desemparelhado por toda a molécula (Figura 8 A). Por isso esse radical não dimeriza como seria o caso para a maioria dos radicais livres. O deslocamento eletrônico é também responsável pela sua cor violeta característica. Quando uma solução etanólica de DPPH$^{\bullet}$ é misturada com uma ou mais substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio, a molécula de DPPH$^{\bullet}$ altera- se para a forma reduzida (Figura 8 B) com perda da coloração violeta e aparecimento de uma cor residual amarela devido à presença do grupo picril (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004).

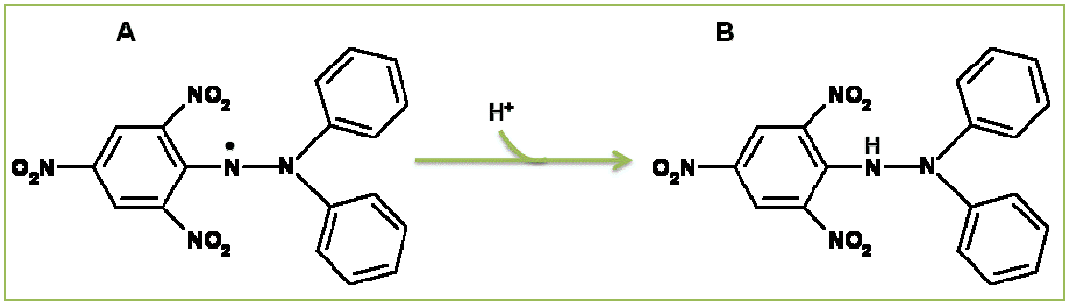



Figura 8: (**A**) radical difenilpicrilhidrazila e (**B**) molécula difenilpicrilhidrazina.
Fonte: Gaikwad, (2010).

Os resultados obtidos através do método do DPPH$^{\bullet}$ têm sido apresentados de várias maneiras, sendo que o indicado na maioria dos estudos é o $IC_{50}$ , que se refere à quantidade de

antioxidante necessária para diminuir 50% da atividade do DPPH$^{\bullet}$ (DENG; CHENG; YANG, 2011).

# *OBJETIVOS*

## 3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

O presente projeto de pesquisa propõe a obtenção e caracterização de nanoemulsões a base de óleo framboesa *(Rubus idaeus*), de maracujá (*Passiflora edulis*) e pêssego (*Prunus pérsica*) e avaliar as propriedades cosméticas da formulação.

Objetivos específicos:

- Avaliação da atividade antioxidante dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego e da mistura (1:1:1) dos óleos:
  - ✓ Medida da atividade doadora de íons $H^+$ ao radical $DPPH^{\bullet}$;
- Desenvolvimento das nanoemulsões:
  - ✓ Determinação do valor de EHL requerido para a mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1);
  - ✓ Determinação do sistema tensoativo utilizado;
  - ✓ Determinação das características físico-químicas e microestruturais;
- Avaliação da influência dos derivados de lanolina nas propriedades físico-químicas das nanoemulsões:
  - ✓ Avaliação da influência da lanolina etoxilada
  - ✓ Avaliação da influência da lanolina acetilada ;
- Avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões:
  - ✓ Estabilidade preliminar;
  - ✓ Estabilidade acelerada;
- Avaliação *in vivo* das nanoemulsões desenvolvidas:
  - ✓ Avaliação da hidratação cutânea;
  - ✓ Avaliação da oleosidade cutânea;
  - ✓ Avaliação do valor de pH cutâneo;
  - ✓ Avaliação do potencial irritante.

# MATERIAL E MÉTODOS

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material:

4.1.1 Fase oleosa:

Óleo de framboesa

INCI: *Rubus idaeus* (*Raspberry seed oil)*

Fornecedor: LIPO DO BRASIL

Óleo de maracujá

INCI: *Passiflora edulis seed oil*

Fornecedor: CRODA

Óleo de pêssego

INCI: *Prunus persica* (*Peach Kernel oil)*

Fornecedor: PHARMASPECIAL

4.1.2 Fase aquosa: água purificada

INCI: Aqua

4.1.3 Tensoativos:

4.1.3.1 Tensoativos lipofílicos:

Monooleato de sorbitano , sigla $T_{MOS}$

INCI: *sorbitan monooleate*

Nome comercial: Span® 80

Valor de EHL: 4,3

Fornecedor: LIPO DO BRASIL

Monolaurato de sorbitano sigla $T_{MLS}$

INCI: *sorbitan monolaurate*

Nome comercial: Span®20

Valor de EHL: 8,6

Fornecedor: LIPO DO BRASIL

Óleo de rícino 15 OE , sigla $T_{15OE}$

INCI: *PEG-15-castor oil*

Nome comercial: Ultramona® R 150

Valor de EHL: 8,3

Fornecedor: OXITENO

4.1.3.2 Tensoativos hidrofílicos:

Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano, sigla $T_{P80}$

INCI: *polysorbate 80*

Nome comercial: Tween® 80

Valor de EHL = 15,0

Fornecedor: OXITENO

Monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE, sigla $T_{P20}$

INCI: *polysorbate 20*

Nome comercial: Tween® 20

Valor de EHL =16,7

Fornecedor: OXITENO

Óleo de Rícino 30 OE, sigla $T_{30OE}$

INCI: *PEG-30 Castor oil*

Nome comercial: Ultramona® R 300

Valor de EHL=11,7

Fornecedor: OXITENO

Óleo de Rícino 36 OE, sigla $T_{36OE}$

INCI: *PEG-36 Castor oil*

Nome comercial: Ultramona® R 360

Valor de EHL= 12,6

Fornecedor: OXITENO

Óleo de Rícino 40 OE, sigla $T_{40OE}$

INCI: *PEG-40 Castor oil*

Nome comercial Ultramona® R 400

Valor de EHL =13,0

Fornecedor: OXITENO

Óleo de Rícino 54 OE , sigla $T_{54OE}$

INCI: *PEG-54 Castor oil*

Nome comercial: Ultramona® R 540

Valor de EHL = 14,4

Fornecedor: OXITENO

4.1.4 Aditivos:

Lanolina etoxilada:

INCI: *PEG-75 Lanolin*

Nome comercial: Super Solan Pastilles

Fornecedor: CRODA

Lanolina acetilada:

INCI: *Acetylated Lanolin Alcohol*

Nome comercial: Crodalan LA

Fornecedor: CRODA

4.1.5 Solventes:

Álcool isopropílico P.A.

Álcool etílico P.A.

Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A.

Solução etanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil DPPH•

Fornecedor: SYNTH

4.1.6 Conservante:

Conservante antimicrobiano:

INCI: *DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate*

Nome comercial: Glydant® plus

4.2 Métodos:

4.2.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos vegetais:

A determinação da atividade antioxidante dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego e da mistura dos óleos (framboesa, maracujá e pêssego 1:1:1) foi realizada através da medida da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical estável $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) pelos óleos vegetais em questão.

- Solubilização dos óleos vegetais:

Para avaliar o solvente mais adequado para a solubilização dos óleos vegetais, três tipos de solventes foram testados (Álcool isopropílico + etanol (1:1); álcool isopropílico e dimetilsulfóxido (DMSO), em várias concentrações dos óleos de framboesa, maracujá, pêssego e da mistura dos óleos (framboesa, maracujá e pêssego 1:1:1) (Tabela 4). A escolha do melhor solvente foi realizada através da análise macroscópica. Os critérios de classificação da solubilização foram: solubilização homogênea (SH) e não solubilização (NS).

.

Tabela 4: Concentração do óleo de framboesa, maracujá, pêssego e da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) em cada solvente para a realização do teste de solubilização.

| Solvente | Concentração dos óleos no solvente (µL/mL) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Álcool isopropílico + etanol (1:1) | 90,90 | 166,66 | 230,77 | 285,71 | 333,33 | 500,00 |
| Álcool isopropílico | 90,90 | 166,66 | 230,77 | 285,71 | 333,33 | 500,00 |
| DMSO | 90,90 | 166,66 | 230,77 | 285,71 | 333,33 | 500,00 |

- Medida da atividade doadora de $H^{+}$ ao radical $DPPH^{\bullet}$

Para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos vegetais em questão, primeiramente uma solução estoque foi preparada para todos os óleos na concentração de 500 de µL/mL (v/v) em solvente previamente determinado no item 4.2.1. Essa solução,

denominada de solução estoque foi diluída várias vezes a fim de obter soluções com concentrações específicas para cada óleo (Figura 9, Tabela 5).

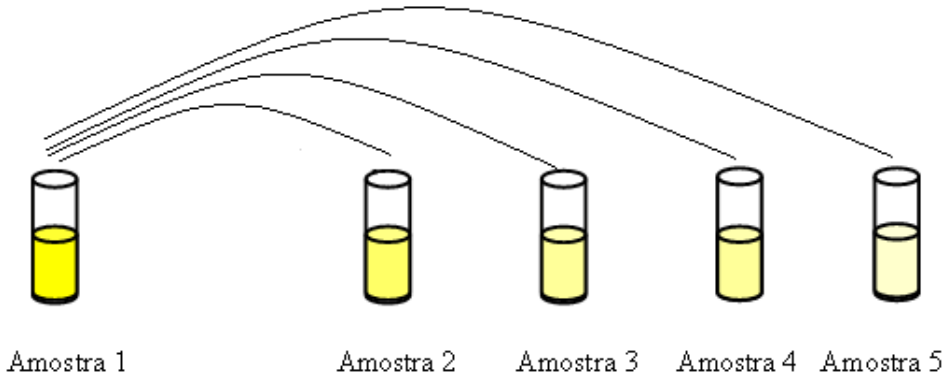



Figura 9: Diluição dos óleos para a determinação da atividade antioxidante dos óleos.

Tabela 5: Concentração final das amostras diluídas no meio reacional.

| Óleos | Concentração das amostras no meio reacional (*) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 | Amostra 5 |
| Framboesa | 3,900 | 2,000 | 1,300 | 1,000 | 0,800 |
| Maracujá | 3,100 | 2,100 | 1,600 | 1,300 | 1,000 |
| Pêssego | 3,360 | 1,680 | 1,340 | 0,670 | 0,560 |
| Mistura dos óleos (**) | 1,760 | 0,704 | 0,503 | 0,350 | 0,290 |

(*) mg/mL; (* *) mistura dos óleos: framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1).

A medida da atividade doadora de $H^+$ ao radical $DPPH^\bullet$ foi avaliada por meio da adição de 1mL de álcool isopropílico + etanol 1:1 (v/v), 100µL da amostra e 250µL de solução de $DPPH^\bullet$ 200 mM em um tubo de ensaio. Quinze minutos após a adição de $DPPH^\bullet$ às amostras, foi feita a leitura em espectrofotômetro Hitashi U2001 no comprimento de onda de 517 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. As absorbâncias das amostras foram convertidas em porcentagem de inibição pela fórmula:

Equação 2

$$(\%) = \frac{Abs_{amostra} * 100}{Abs_{controle}} - 100$$

A partir das porcentagens de inibição foi calculado o $IC_{50}$ do radical estável $DPPH^{\bullet}$ pelo GraphPad Prism software. O $IC_{50}$ refere- se à concentração dos óleos puros que apresenta 50% de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ (BLOIS, 1958; GEORGETTI *et al.,* 2009).

4.2.2. Determinação do valor de EHL requerido:

Para a determinação do valor de EHL do sistema, utilizou-se cinco tensoativos combinados de modo a originarem cinco diferentes misturas:

**(1) $T_{P20}$/ $T_{MLS}$**

monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE/ monolaurato de sorbitano;

**(2) $T_{P80}$/$T_{MOS}$**

monooelato de sorbitano etoxilado 20 OE/ monooelato de sorbitano;

**(3) $T_{P20}$/ $T_{MOS}$**

monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE/ monooelato de sorbitano;

**(4) $T_{P80}$/$T_{MLS}$**

monooelato de sorbitano etoxilado 20 OE/ monolaurato de sorbitano.

**(5) $T_{36OE}$ / $T_{MOS}$**

*PEG-36 Castor oil/* monooelato de sorbitano

O EHL requerido foi determinado para a mistura dos óleos (framboesa, maracujá e pêssego 1:1:1). Para cada mistura de tensoativos, o intervalo de valores de EHL testado esteve entre o valor de EHL mínimo e máximo do sistema, variando de 1 em 1 ponto, baseado na seguinte fórmula.

Equação 3:

$$A + B = 100$$

$$EHL_A \times 0{,}001 + EHL_B \times 0{,}01 = EHL_{resultante}$$

onde:

A = porcentagem de tensoativo hidrofílico;
B = porcentagem de tensoativo lipofílico;
$EHL_A$ = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A;
$EHL_B$ = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B;
$EHL_{resultante}$ = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante.

Decorridas 24 horas, procedeu-se a análise macroscópica das formulações. O maior volume de creme e o menor tamanho inicial de glóbulos foram usados como indicadores de estabilidade das emulsões (GULLAPALLI; SHETH,1999).

4.2.3 Determinação do sistema tensoativo:

Os pares de tensoativos no valor de EHL requerido foram utilizados em proporções de modo a garantir o valor de EHL da mistura dos óleos determinado previamente através do método descrito no item 4.2.2.

**(6) $T_{MOS}/T_{30OE}$**
monooelato de sorbitano/ *PEG-30 Castor oil*

**(7) $T_{MOS}/T_{36OE}$**
monooelato de sorbitano/ *PEG-36 Castor oil*

**(8) $T_{MOS}/T_{40OE}$**
monooelato de sorbitano/ *PEG-40 Castor oil*

**(9) $T_{MOS}/T_{54OE}$**
monooelato de sorbitano/ *PEG-40 Castor oil*

**(10)$T_{15OE}/T_{30OE}$**
*PEG-15 Castor oil/ PEG-30 Castor oil*

**(11)$T_{15OE}/T_{36OE}$**
*PEG-15 Castor oil/ PEG-36 Castor oil*

**(12)$T_{15OE}$/$T_{40OE}$**

*PEG-15 Castor oil*/ PEG-40 Castor oil

**(13)$T_{15OE}$/$T_{45OE}$**

*PEG-15 Castor oil/ PEG-54 Castor oil*

4.2.4 Preparo da nanoemulsão:

- Metodologia EPI (*Emulsion Phase Inversion*)

As fases aquosa e oleosa, foram aquecidas separadamente a 75± 5°C. A fase aquosa foi vertida lentamente sob a fase oleosa contendo tensoativo, mantendo-se o sistema sob agitação constante até que atingisse a temperatura ambiente 25 ± 5°C. Após 24 horas, todas as formulações foram avaliadas macro e microscopicamente (MARUNO; ROCHA-FILHO, 2010).

4.2.4.1 Caracterização físico-química das nanoemulsões:

- Teste de Centrifugação:

Com auxílio da centrífuga Fanem modelo 206-R, as amostras das nanoemulsões foram submetidas aos seguintes ciclos: 1000 (70g) , 2500 (440g) e 3500 (863g) r.p.m. durante 15 minutos (em cada rotação). A avaliação foi realizada em triplicata (MARUNO, 2009).

- Granulometria da nanoemulsão:

A granulometria e o índice de polidispersividade das nanoemulsões foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (*photon correlation spectroscopy*) no aparelho Malvern Zetasizer modelo ZS. As análises foram realizadas em um ângulo de 90° e à temperatura constante (25°C). As análises foram realizadas em triplicata (MARUNO, 2009).

- Determinação da condutividade:

Foi determinada à temperatura ambiente (25±2°C) utilizando-se condutivímetro mCA 150 inserindo o eletrodo diretamente nas amostras. O teste foi realizado em triplicata (MORAIS *et al.*,2006).

- Determinação do valor de pH:

Foi determinado à temperatura ambiente (25±2°C) inserindo o eletrodo (Peagômetro Digimed mod. DM 20) diretamente na amostra. O teste foi realizado em triplicata (MARUNO, 2009).

4.3 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na formulação:

Após a determinação do sistema tensoativo, a nanoemulsão composta pelo par de tensoativo $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$ foi aditivada de lanolina etoxilada ou acetilada nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% e 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente. As alterações macro e microscópicas foram avaliadas e todas as amostras foram submetidas à análise granulométrica, condutividade, valor de pH e testes de centrifugação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.1 Determinação do valor de EHL das nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina:

Para determinar o valor de EHL das nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina, o par de tensoativo $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$ foi utilizado uma vez que produziram formulações estáveis. A determinação do valor de EHL foi realizada de acordo com o 4.2.2.

4.3.2 Determinação da tensão interfacial das nanoemulsões:

A tensão interfacial das nanoemulsões foi medida à temperatura ambiente em um tensiômetro Scientific Fisher baseado no método de Du Nouy, utilizando um anel rígido de platina. As fases, aquosa e oleosa, e os derivados de lanolina em diferentes concentrações foram usados para a preparação das nanoemulsões (YANG, CHO, PARK**;**2009).

4.4 Estabilidade preliminar das nanoemulsões:

- Estresse térmico:

Amostras de 5 g de cada formulação foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho termostatizado (Nova Técnica Ltda – Modelo 281 NT), na faixa de temperatura de 40± 2°C a 80 ± 2°C, variando-se a temperatura em 5°C a cada 30 minutos (Branconi *et al.,* 1995). Ao final de cada ciclo (30 minutos) avaliações macroscópicas foram realizadas a fim de detectar fenômenos de instabilidade como cremeação ou coalescência. A avaliação foi realizada em triplicata.

4.5 Estabilidade acelerada das nanoemulsões:

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos, com tampa, garantindo boa vedação. A duração do estudo foi de 90 dias. As amostras foram submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: estufa T= 50±2 °C, refrigeradore T= 5±2°C, e temperatura ambiente 25±2°C, mantidas ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas nos tempos 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias (ANVISA, 2004).

Os parâmetros físico-químicos como: tamanho de partícula, condutividade e valor de pH foram avaliados.

4.6 Avaliação *in vivo* da influência das nanoemulsões na hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneos:

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de ética em Humanos, conforme anexo A. A avaliação foi realizada em sala climatizada com umidade relativa e temperatura controlada (UR: 75±5%; T: 24±2°C). Participaram do estudo, como voluntárias, 20 mulheres de 21 a 35 anos, sem histórico de reações alérgicas a produtos cosméticos e com a pele dos antebraços íntegra. Duas horas antes do início do teste o antebraço da voluntária foi lavado com sabonete neutro e, antes da aplicação da amostra, a voluntária permaneceu na sala por quinze minutos para aclimatação.

As amostras testadas, (i) nanoemulsão composta por $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$ e 6% de lanolina etoxolada e (ii) nanoemulsão composta por $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$ e 2% de lanolina acetilada foram aplicadas em regiões do antebraço previamente determinadas (Figura 10), através de movimentos circulares e suaves.

A avaliação de potencial hidratante, oleosidade e valor de pH cutâneos foram realizadas de acordo com protocolo proposto por Maruno (1998). Os dados foram submetidos à análise estatística empregando o método de análise de variância “one way ANOVA” seguido pelo teste de Tukey.

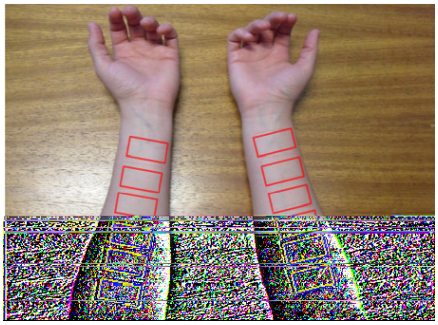


Figura 10: Representação das regiões do antebraço demarcadas para a avaliação *in vivo.*
Fonte: Oliveira, (2010)

4.6.1 Avaliação da influência das nanoemulsões na hidratação cutânea:

Foi utilizado o aparelho Corneometer® CM 820 (Courage + Khazaka), que avalia a capacitância da pele. O método é baseado na variação das constantes dielétricas da água e outras substâncias. Um capacitor reage a alterações de quantidade de água, expressando o resultado em unidades arbitrárias (UA) que é considerado, então, como grau de hidratação da pele (COURAGE + KHAZAKA). Foram realizadas três leituras para cada região selecionada e calculada a hidratação relativa (HR%) segundo a equação 4. Esta consiste na variação percentual entre a capacitância medida em função do tempo. As leituras foram feitas em intervalos de 30 minutos até completar o período de 150 minutos. Entre as leituras o eletrodo do equipamento foi limpo com papel até que a leitura fosse zero.

Equação 4

$$HR\% = \frac{Mp \times 100}{Mc}$$

onde:

HR% = hidratação relativa;

Mp = Média da capacitância das leituras das regiões de aplicação do produto;

Mc = Média da capacitância das leituras das regiões controle.

4.6. 2 Avaliação da influência das nanoemulsões na oleosidade cutânea:

Foi empregado o equipamento Sebumeter® SM 810 (Courage +Khazaka) que mede a oleosidade cutânea baseado na fotometria de uma fita plástica especial de 0,1mm de espessura disposta em um carretel, avançado manualmente a cada leitura, que se torna transparente quando em contato com lipídios. Sob esta fita há uma pequena superfície espelhada que

reflete a luz através da fita (Figura 11) medindo indiretamente o volume de secreção sebácea das glândulas (HARRIS, 2003). A leitura foi realizada aplicando a fita sobre a área de teste e pressionando por trinta segundos. Em seguida esta foi inserida no aparelho para a leitura fotométrica da transparência. Este dado é convertido pelo aparelho sendo o resultado expresso em µg de sebo por $cm^2$.

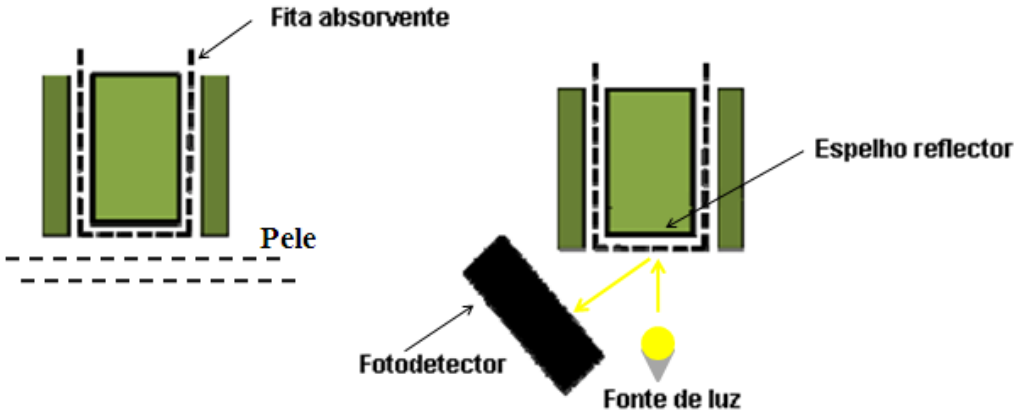



Figura 11: Princípio de medida do Sebumeter®. Adaptado de Harris (2003).

4.6. 3 Avaliação da influência das nanoemulsões no valor de pH cutâneo:

A medida do valor de pH cutâneo foi feita diretamente sobre a pele nos locais selecionados dos voluntários empregando o equipamento Skin-pHmeter® PH 900 (Courage + Khazaka) que possui um eletrodo adaptado a leituras de superfícies. Foram realizadas três leituras de cada região a cada 30 minutos até completar o período de 150 minutos. Entre as leituras o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel.

4.7 Avaliação *in vivo* do potencial irritante das nanoemulsões:

Para a determinação do potencial irritante das nanoemulsões, a alteração na coloração da pele, provocada pela aplicação destes produtos foi avaliada utilizando se o Chroma Meter CR-200. A avaliação da alteração da coloração da pele foi feita pelo sistema L*a*b*. O modo L*a*b* cobre a integralidade do espectro visível pelo olho humano e representa-o de maneira uniforme. Permite, por conseguinte descrever o conjunto das cores visíveis independentemente de qualquer tecnologia gráfica. **L***é a luminância ou luminosidade, expressa em percentagem (0 para o preto à 100 para o branco); **a* (cor)** e **b*(saturação da cor)** que vão respectivamente do verde ao vermelho (valores negativos para positivos) e do amarelo ao azul (valores negativos para positivos).

(http://pt.kioskea.net/contents/video/cie-lab.php3). A Figura 12 representa a leitura do Chroma Meter no sistema L*a*b*.

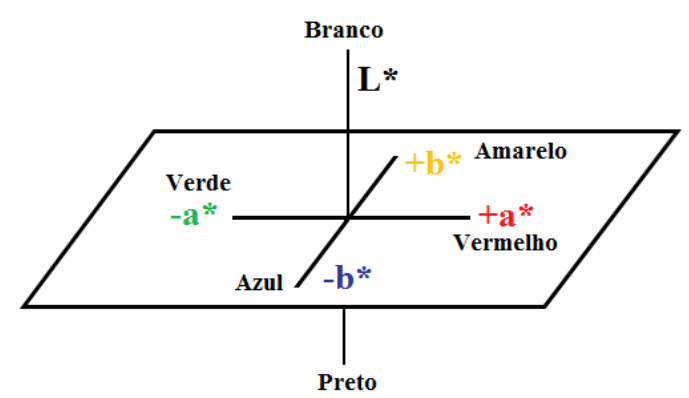



Figura 12: Representação das coordenadas L*a*b* definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE).

Como o potencial irritante caracteriza-se muitas vezes pela formação de eritema, causando coloração avermelhada na pele, quando esta entra em contato com alguma substância irritante, a avaliação do potencial irritante das nanoemulsões foi analisada por alterações no parâmetro a* (DARLENSKI, FISCHER, BASKETTER; 2008).

4.8 Análise estatística:

As diferenças nos resultados de tamanho de glóbulo, índice de polidispersividade, valores de condutividade e pH realizados durante o teste de estabilidade, foram avaliados usando one-away ANOVA análises de variância, seguido pelo teste de Tukey.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos vegetais:

- Solubilização dos óleos vegetais:

Diferentes solventes podem causar diferenças no padrão oxidativo entre os óleos, uma vez que os mesmos podem influenciar a habilidade do antioxidante em doar íons hidrogênio (SCHWARZ *et al*., 2000; HAMADAN; MOERSEL, 2006). Maruno, (2009), observou que quando os óleos vegetais de framboesa e gergelim foram solubilizados em acetato de etila, a porcentagem de inibição desses óleos foi menor quando comparada ao álcool isopropílico. Porém, no presente estudo o solvente foi utilizado apenas com a finalidade de solubilização, não havendo o interesse em avaliar a interferência dos mesmos na capacidade de doação de íons hidrogênio desses óleos. Deste modo, dos três diferentes solventes testados, o álcool isopropílico foi capaz de solubilizar completamente os óleos em todas as concentrações testadas (Tabela 6).

Tabela 6: Solubilização dos óleos de framboesa, maracujá, pêssego e da mistura dos óleos(*).

| Solvente | Concentração dos óleos solvente (µL/mL) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 90,90 | 166,66 | 230,77 | 285,71 | 333,33 | 500,00 |
| Álcool isopropílico + etanol (1:1) | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| Álcool isopropílico | ***SH*** | ***SH*** | ***SH*** | ***SH*** | ***SH*** | ***SH*** |
| DMSO | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

(SH) = solubilização homogênea, (NS) = não solubilização
(*) mistura composta pelos óleos de framboesa maracujá e pêssego (1:1:1).

- Medida da atividade doadora de $H^+$ dos óleos vegetais ao radical $DPPH^•$:

Os óleos vegetais são substâncias ricas em compostos fenólicos, funções orgânicas caracterizadas por uma hidroxila ligada a um anel aromático (Figura 13). Esses compostos são doadores de elétrons uma vez que seu grupo hidroxila tem alta atividade e habilidade de neutralizar radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Por outro lado, os produtos intermediários formados pela ação desses antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (DENG; CHENG; YANG,2011).Os óleos vegetais, são substâncias ricas em compostos fenólicos como flavonóides, ácido elágico, vitaminas C e E, conferindo a estes óleos atividade antioxidante.

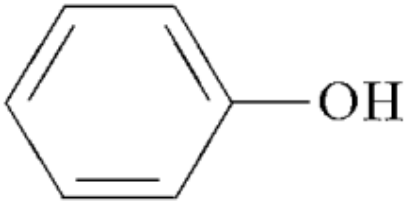



Figura 13: Função orgânica fenol
Fonte: www.brasilescola.com/quimica/fenois.htm

Dentre os diferentes métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante, a medida da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical $DPPH^•$ é muito utilizada por ser uma metodologia rápida, precisa e de baixo custo. A concentração de antioxidante necessária para causar diminuição de 50% na concentração inicial de $DPPH^•$ ($IC_{50}$) é um parâmetro extensamente utilizado na medida da atividade antioxidante sendo que, quanto menor o $IC_{50}$ maior a atividade antioxidante. Deste modo, o $IC_{50}$ foi de 1,570 mg/mL, 1,520 mg/mL, 1,436 mg/mL e 0,496mg/mL para o óleo de framboesa, maracujá, pêssego e para a mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1), respectivamente (Figuras 14, 15, 16 e 17 ). A mistura dos óleos apresentou o menor $IC_{50}$ o qual se refere a maior atividade antioxidante. Este resultado pode estar relacionado a um possível sinergismo dos óleos. Um resultado semelhante foi determinado em nosso grupo, por Guerreiro, (2010), quando realizou um estudo da atividade antioxidante dos óleos de damasco (*Prunus armeniaca*), de pêssego (*Prunus persica*) e da mistura dos óleos de damasco e pêssego (1:1), utilizando como solvente o álcool isopropílico, determinando valores de $IC_{50}$ iguais a 0,895 mg/mL, 1,436 mg/mL e 0,466 mg/mL, respectivamente, obtendo maior atividade antioxidante para a mistura dos

óleos. O efeito sinergístico entre substâncias antioxidantes tem sido relatado pela literatura tanto para substâncias naturais como gorduras e óleos vegetais quanto para substâncias sintéticas como o BHT e BHA, mostrando que a combinação de compostos antioxidantes resulta em maior atividade antioxidante que o uso dessas substâncias separadamente (SHARMA; PEREZ; ERHAN, 2007; MIRANOVA; TONEVA; YANISHLIEVA, 2008; GUZMAN *et al*., 2009).

Segundo Guzman et al., (2009), o efeito sinergístico entre misturas de substâncias antioxidantes pode ser explicado pelo mecanismos de regeneração:

O antioxidante mais ativo doa íons hidrogênio para o radical livre, inibindo a taxa de oxidação. O antioxidante resultante pode reagir com outros radicais livres, contribuindo para a inibição da oxidação.Porém quando existem misturas de substâncias antioxidantes, um antioxidante menos ativo pode doar íons hidrogênio para o outro mais ativo , regenerando-o e transformando-se no radical estável que pode interagir com outros radicais livres. Através desse mecanismo, o doador é consumido enquanto o aceptor propaga a inibição da oxidação, resultando assim em um efeito sinérgico (GUZMAN *et al*., 2009).

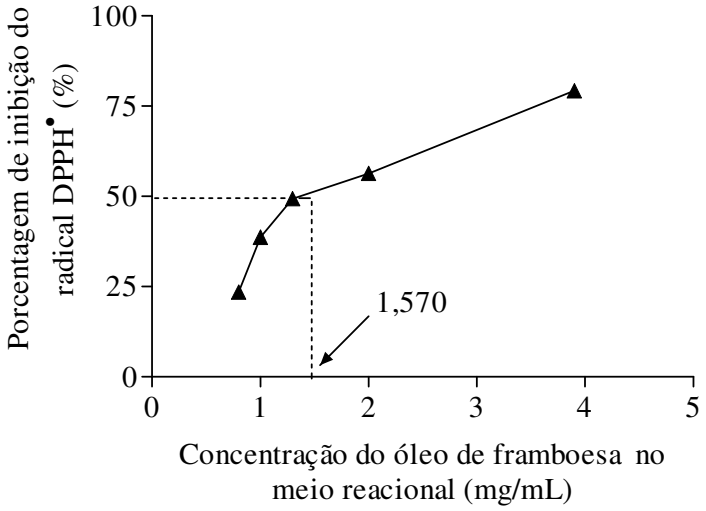



Figura 14: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de framboesa ao radical $DPPH^•$ expressa através do $IC_{50}$ do óleo.

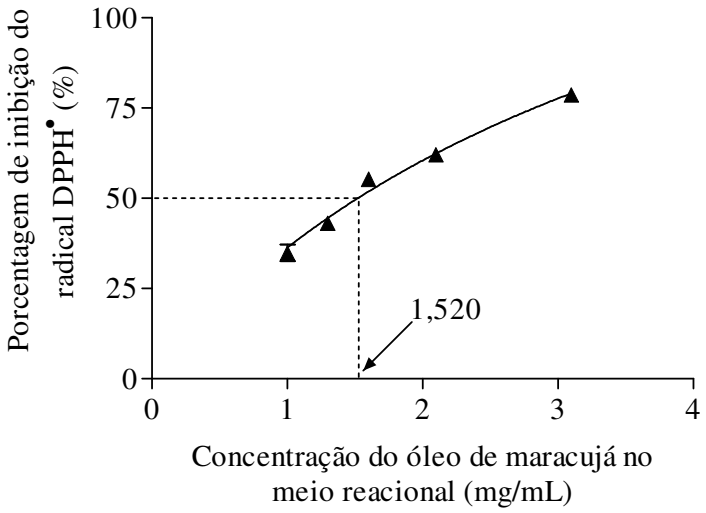



Figura 15: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de maracujá ao radical $DPPH^\bullet$ expressa através do $IC_{50}$ do óleo.

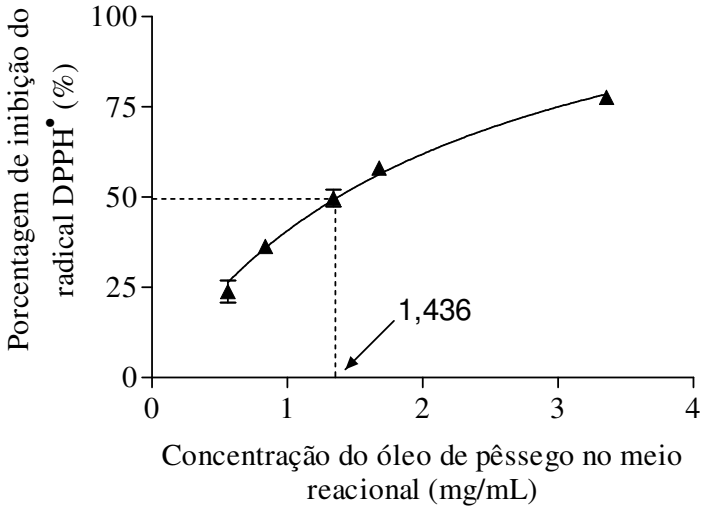



Figura 16: Medida da atividade doadora de $H^+$ do óleo de pêssego ao radical $DPPH^\bullet$ expressa através do $IC_{50}$ do óleo.

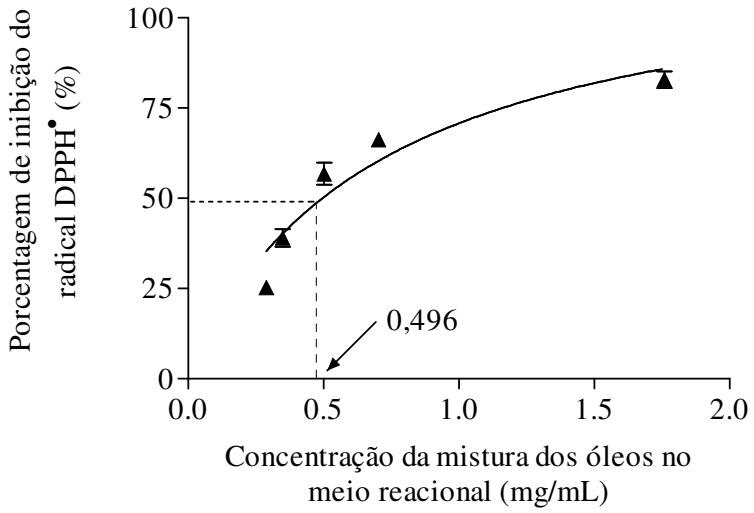



Figura 17: Medida da atividade doadora de $H^+$ da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1)ao radical $DPPH^•$ expressa através do $IC_{50}$ do óleo.

Em vários estudos relatados pela literatura, antioxidantes sintéticos como BHT (butilhidroxitolueno) e ácido ascórbico são utilizados como controle na avaliação da atividade antioxidante de determinadas substâncias. Maksimovic, (2008), determinou o valor de $IC_{50}$ de 0,0194 mg/mL e 0,0041 mg/mL para o BHT e ácido ascórbico, respectivamente. Quando comparada a extratos e antioxidantes sintéticos, a atividade antioxidante dos óleos vegetais é um pouco menor (MAKSIMOVIC *et al.,* 2008; SOUZA *et al.,* 2009), devido a um maior $IC_{50}$ dos óleos, porém, os óleos vegetais possuem atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical $DPPH^•$. Após a realização da medida da atividade doadora de $H^+$ ao $DPPH^•$, optou-se por utilizar a mistura dos óleos como fase oleosa dos sistemas nanoemulsionados, devido à maior atividade antioxidante da mesma.

5.2 Determinação do EHL requerido para a mistura de óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1)**:**

A estabilidade física e manutenção da fase contínua de emulsões O/A por tensoativos não-iônicos ocorre por impedimento estérico e pontes de hidrogênio. A parte apolar do tensoativo fica inserida no interior hidrofóbico do glóbulo enquanto os grupos de óxido de etileno na fase aquosa de forma que estes inibem os choques entre os glóbulos de óleo, impedindo a coalescência. O aumento da concentração de tensoativos pode favorecer a formação de um filme mais compacto em volta do glóbulo de óleo, reduzindo ainda mais a taxa de coalescência (MORAIS *et al.,* 2008).

O Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) foi um conceito introduzido por Griffin, para expressar numericamente a relação existente entre as porções hidrofílica e lipofílica de moléculas anfifílicas. Cada emulsão, em particular, possui um valor de EHL específico, que depende do óleo utilizado, da proporção dos componentes e ainda se esse óleo vai constituir a fase interna ou externa da emulsão. O valor de EHL requerido para um óleo ou sistema oleoso é determinado através da preparação de uma série de emulsões com tensoativos apropriados em uma faixa de EHL (MORAIS *et al.*, 2008). A Tabela 7 mostra a composição qualitativa e quantitativa das emulsões preparadas para a determinação do valor de EHL requerido para a mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1).

Tabela 7: Composição qualitativa e quantitativa dos pares de tensoativos, mantendo constante a concentração de fase oleosa 10,0 % (p/p) e de água purificada 85,0% (p/p) das formulações para a determinação do valor de EHL requerido para a mistura dos óleos (*).

| Valor de EHL | (1) $T_{P20}$/ $T_{MLS}$ (p/p) (%) | (2) $T_{P80}$/$T_{MOS}$ (p/p) (%) | (3) $T_{P20}$/$T_{MOS}$ (p/p) (%) | (4) $T_{P80}$/$T_{MLS}$ (p/p) (%) | (5)$T_{36OE}$/$T_{MOS}$ (p/p) (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 4,3 | - | 0,00/ 5,00 | 0,00/ 5,00 | _ | 0,00/5,00 |
| 5,0 | - | 0,33/ 4,67 | 0,28/ 4,72 | _ | 0,40/4,60 |
| 6,0 | - | 0,79/ 4,21 | 0,69/ 4,31 | _ | 1,00/4,00 |
| 7,0 | - | 1,26/ 3,74 | 1,09/ 3,91 | _ | 1,63/3,37 |
| 8,0 | - | 1,73/ 3,27 | 1,49/ 3,51 | _ | 2,23/2,77 |
| 8,6 | 0,00/ 5,00 | _ | _ | 0,00/ 5,00 | _ |
| 9,0 | 0,25/ 4,75 | 2,20/ 2,80 | 1,90/ 3,10 | 0,31/ 4,69 | 2,83/2,17 |
| 10,0 | 0,86/ 4,14 | 2,66/ 2,34 | 2,30/ 2,70 | 1,09/ 3,91 | 3,43/1,57 |
| 11,0 | 1,48/ 3,52 | 3,13/ 1,87 | 2,70/ 2,30 | 1,87/ 3,13 | 4,04/0,96 |
| 12,0 | 2,10/ 2,90 | 3,60/ 1,40 | 3,10/ 1,90 | 2,66/ 2,34 | 4,65/0,35 |
| 13,0 | 2,72/ 2,28 | 4,07/ 0,93 | 3,51/ 1,49 | 3,44/ 1,56 | _ |
| 14,0 | 3,33/ 1,67 | 4,53/ 0,47 | 3,91/ 1,09 | 4,22/ 0,78 | _ |
| 15,0 | 3,95/ 1,05 | 5,00/ 0,00 | 4,31/ 0,69 | 5,00/ 0,00 | _ |
| 16,0 | 4,57/ 0,43 | _ | 4,72/ 0,28 | _ | _ |
| 16,7 | 5,00/ 0,00 | _ | 5,00/ 0,00 | _ | _ |

(*) Mistura oleosa composta por: óleo de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1).

Nas formulações preparadas com os pares (1), (2), (3) e (4) de tensoativos , onde houve cremeação dos sistemas, o EHL foi dado pela formulação que apresentou o maior volume de cremeado após 24 horas de preparo, (EHL = 9, veja Tabela 8) (GULLAPALLI;

SHETH, 1999). O EHL ótimo corresponde àquele onde a emulsão apresenta estabilidade máxima (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). O par (5) apresentou formulações estáveis, sem floculação, cremeação ou coalescência nos valores de EHL 8 e 9, permanecendo estáveis após o terceiro ciclo de centrifugação. Essas formulações apresentaram tamanho de glóbulos de 357, 18 ± 5,12 e 183, 59 ± 3,84 nm, respectivamente. Para ZHANG; QUE, (2008) o tamanho dos glóbulos seria muito menor no valor de EHL ótimo da mistura de tensoativos, portanto, confirmando para este sistema, o EHL ótimo = 9 que apresentou o menor tamanho de glóbulos.

Tabela 8: Avaliação macroscópica das formulações após 24 horas de preparo para a determinação do EHL ótimo da mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1).

| EHL | (1)$T_{P20}$/ $T_{MLS}$ | (2)$T_{P80}$/$T_{MOS}$ | (3)$T_{P20}$/$T_{MOS}$ | (4)$T_{P80}$/$T_{MLS}$ | (5)$T_{36OE}$/$T_{MOS}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 4,3 | Separação | Separação | Separação | Separação | Separação |
| 5,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | Separação |
| 6,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | Separação |
| 7,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | Cremeação |
| 8,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | Normal |
| 9,0 | ***Cremeação*** | ***Cremeação*** | ***Cremeação*** | ***Cremeação*** | ***Normal*** |
| 10,0 | Cremeação | Cremeação | Cremeação | Cremeação | Separação |
| 11,0 | Cremeação | Cremeação | Cremeação | Cremeação | Separação |
| 12,0 | Cremeação | Cremeação | Cremeação | Separação | Separação |
| 13,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | _ |
| 14,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | _ |
| 15,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | _ |
| 16,0 | Separação | Separação | Separação | Separação | _ |
| 16,7 | Separação | Separação | Separação | Separação | _ |

Neste caso, ficou estabelecido através dos experimentos realizados que o valor de EHL ótimo para a mistura dos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) é o EHL de valor 9,0.

5.3 Determinação do sistema tensoativo para a obtenção da nanoemulsão**:**

Um dos principais fatores que controla o processo de emulsificação é a estrutura e concentração de tensoativos e consequentemente a tensão interfacial do sistema, uma vez que o aumento na concentração de tensoativos geralmente provoca diminuição da tensão interfacial, promovendo emulsificação do sistema (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Segundo a literatura, é possível a obtenção de emulsões a partir de um único tensoativo, porém, emulsões mais estáveis são formadas pela combinação destes agentes, lipofílicos e hidrofílicos, uma vez que os mesmos podem adsorverem- se à interface O/A formando um filme interfacial coeso,. Baseado nesses conceitos, uma série de pares de tensoativos foram propostos, utilizando-se $T_{MOS}$ e $T_{15OE}$ como tensoativos lipofílicos e $T_{30OE}$, $T_{36OE}$, $T_{40OE}$ e $T_{54OE}$ como tensoativos hidrofílicos (Tabela 9). Os parâmetros analisados para a determinação do par de tensoativos foram o tamanho dos glóbulos, a estabilidade e as características relacionadas à nanoemulsão como, transparência e reflexo azulado (TADROS *et al.*, 2004).

Tabela 9: Composição qualitativa e quantitativa das formulações mantendo constante a concentração de fase oleosa (*) 10,0 % (p/p) e de água purificada 85,0% (p/p) para a determinação do sistema tensoativo.

| Formulação | $T_{MOS}$ (p/p)(%) | $T_{15OE}$ (p/p)(%) | $T_{30OE}$ (p/p) (%) | $T_{36OE}$ (p/p) (%) | $T_{40OE}$ (p/p) (%) | $T_{54OE}$ (p/p) (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 3,65 | - | 6,35 | - | - | - |
| 7 | 4,34 | - | - | 5,66 | - | - |
| 8 | 4,60 | - | - | - | 5,40 | - |
| 9 | 5,34 | - | - | - | - | 4,66 |
| 10 | - | 7,93 | 2,07 | - | - | - |
| 11 | - | 8,36 | - | 1,64 | - | - |
| 12 | - | 8,51 | - | - | 1,49 | - |
| 13 | - | 8,85 | - | - | - | 1,15 |

(*) Mistura oleosa composta por: óleo de framboesa, maracujá pêssego (1:1:1).

Todos os sistemas tensoativos propostos (Tabela 9) resultaram em formulações translúcidas, característica de nanoemulsões. Os sistemas de 6, 7, 8 e 9 apresentaram tendência em formarem nanoemulsões mais leitosas com o aumento do grau de etoxilação do

tensoativo hidrofílico (esta tendência pode ser visualizada na Tabela 10) enquanto os sistemas 10,11,12 e 13 apresentaram aspecto translúcido e de cor esverdeada.

Métodos de emulsificação de baixa energia são capazes de formar glóbulos nanométricos com estreita distribuição. Este fato está relacionado ao tipo de estrutura formada no ponto de inversão da emulsão. Como a fase aquosa é vertida na fase oleosa, o sistema inicial é uma microemulsão A/O. Com o aumento do volume de água, estruturas bícontínuas ou lamelares são formadas, decompondo-se em pequenos glóbulos de óleo quando o ponto de inversão de fases é passado. Esta decomposição é facilitada pela tensão interfacial mínima no ponto de inversão e a alta concentração de tensoativos, que permite a completa solubilização do óleo próximo ao ponto de inversão, uma vez que, uma baixa ou média concentração de tensoativos resulta em glóbulos grandes com distribuição heterogênea ( SOLÉ et al., 2003; FERNANDEZ et al., 2004; SOLANS et al., 2005; MAESTRO et al., 2008). A quantidade de tensaotivos utilizado (10%) foi capaz de formar nanoemulsões com pequeno tamanho de glóbulos e possibilitou a formação de estruturas bicontínuas ou lamelares, que se decompuseram em nanoglóbulos de menor tamanho. O par de tensotivos $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$ foi o que resultou em formulações com menor tamanho de glóbulos (Tabela 10), provavelmente esse par de tensoativos favoreceu uma mais completa solubilização da fase oleosa e uma menor tensão interfacial do sistema. Para a determinação do sistema tensoativo mais adequado, a estabilidade frente à centrifugação (Tabela 11) e estresse térmico (Tabela 12) foram avaliados.

Tabela 10: Análise granulométrica das formulações para a determinação do sistema tensoativo.

| Formulação | Tamanho do glóbulo ± DP (nm) |
|---|---|
| (6) $T_{MOS}/T_{30OE}$ | 51,0±5,2 |
| (7) $T_{MOS}/T_{36OE}$ | 48,0±7,2 |
| (8) $T_{MOS}/T_{40OE}$ | 118,0±37,0 |
| (9) $T_{MOS}/T_{54OE}$ | 187,0±34,0 |
| (10)$T_{15OE}/T_{30OE}$ | 63,0±10,0 |
| (11)$T_{15OE}/T_{36OE}$ | 72,0±16,0 |
| (12)$T_{15OE}/T_{40OE}$ | 64,0±16,0 |
| (13)$T_{15OE}/T_{45OE}$ | 63,0±16,0 |

(*) DP = desvio padrão.

O teste de centrifugação é de grande interesse, uma vez que fornece informações rápidas sobre as propriedades de estabilidade da formulação. Os fenômenos de cremeação,

sedimentação e separação de fases que podem ser detectados em condições normais de armazenamento, são avaliados em tempo menor e podem ser acelerados pela centrifugação,. Este teste é especialmente empregado para avaliar a estabilidade de emulsões durante a fase de pré-formulação, portanto, a centrifugação é uma ferramenta útil para predizer a estabilidade de emulsões (BADOLATO *et al.,* 2008; CASAGRANDE; BARACAT; GEORGETTI, 2009). Dentre as amostras analisadas, nenhuma apresentou cremeação, sedimentação ou separação de fases após o teste de centrifugação, mostrando-se, portanto, estáveis (Tabela 11).

Tabela 11: Comportamento das formulações frente à centrifugação para a determinação do sistema tensoativo.

| Formulação | 1° ciclo | 2° ciclo | 3° ciclo |
|---|---|---|---|
| (6) $T_{MOS}/T_{30OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (7) $T_{MOS}/T_{36OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (8) $T_{MOS}/T_{40OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (9) $T_{MOS}/T_{54OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (10)$T_{15OE}/T_{30OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (11)$T_{15OE}/T_{36OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (12)$T_{15OE}/T_{40OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (13)$T_{15OE}/T_{45OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |

NR= Normal, sem alteração, homogêneo; LM = Levemente modificado, não homogêneo; M = Modificado, com separação de fases.

Segundo Aulton (2005), o aumento da temperatura pode ocasionar aumento da velocidade de cremeação, devido à diminuição da viscosidade aparente da fase contínua, bem como ocasionar o aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa quanto do tensoativo na interface da emulsão, favorecendo a coalescência.

Dentre as amostras submetidas ao teste de estresse térmico, todas mostraram-se estáveis (Tabela 12) até à temperatura de 50°C, valor máximo de temperatura preconizado pela ANVISA (2004), para realização de testes de estabilidade. A formulação n° 7 mostrou-se estável até a temperatura de 60°C, e a formulação n° 8 até 65°C apresentando leves modificações em temperaturas superiores, enquanto a formulação n° 9 permaneceu estável até 80°C.

Tabela 12: Comportamento das formulações frente ao estresse térmico para determinação do sistema tensoativo.

| | Temperatura (°C) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Formulação** | **40** | **45** | **50** | **55** | **60** | **65** | **70** | **75** | **80** |
| (6) $T_{MOS}/T_{30OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM | LM | LM |
| (7) $T_{MOS}/T_{36OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM |
| (8) $T_{MOS}/T_{40OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM |
| (9) $T_{MOS}/T_{54OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| (10)$T_{15OE}/T_{30OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM | LM | LM |
| (11)$T_{15OE}/T_{36OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM | LM | LM |
| (12)$T_{15OE}/T_{40OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM | LM | LM |
| (13)$T_{15OE}/T_{45OE}$ | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** | LM | LM | LM | LM | LM | LM |

NR= Normal, sem alteração, homogêneo; LM = Levemente modificado, não homogêneo; M = Modificado, com separação de fases.

Com base nos resultados apresentados acima, a formulação n°7 composta pelo par de tensoativo $T_{MOS}$ e $T_{36OE}$, apresentou o menor tamanho de glóbulo (Tabela 10) , e manteve estabilidade frente ao testes preliminares, sendo considerada a mais adequada dentre as formulações testadas para ser submetida aos próximos testes.

5.4 Avaliação da influência dos derivados da lanolina nas características físico-químicas da nanoemulsão:

5.4.1 Influência da lanolina etoxilada:

A lanolina (do latim *lana*, lã) é, mistura complexa de ésteres formados a partir de inúmeras combinações entre diversos alcoóis de cadeia longa ($C_7$ a $C_{40}$) e por ácidos graxos ($C_{14}$ a $C_{36}$) derivados da secreção das glândulas sebáceas do carneiro acumuladas na lã desse. É empregada desde o antigo Egito (± 2000 a.C.) e em larga escala nos dias atuais como emoliente e veículo para cosméticos e medicamentos em razão da excelente propriedade oclusiva, de penetração e manutenção da hidratação da pele, uma vez que artigos cientificos demonstram a capacidade em penetrar na pele e auxiliando o armazenamento da água no estrato córneo (STONE 2000; MARTINS *et al.,* 2005). A nanoemulsão obtida previamente (formulação 7 composta por $T_{MOS}/T_{36OE}$) foi acrescida de lanolina etoxilada em diferentes

concentrações (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0%), e os parâmetros tamanho de glóbulo, condutividade e valor de pH foram mensurados.

Os dados mostrados na Figura 18 evidenciam aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) dos glóbulos em relação à formulação inicial, porém, esse aumento não é dependente da concentração do aditivo, uma vez que não existe uma relação linear entre a concentração de lanolina e o tamanho dos glóbulos.

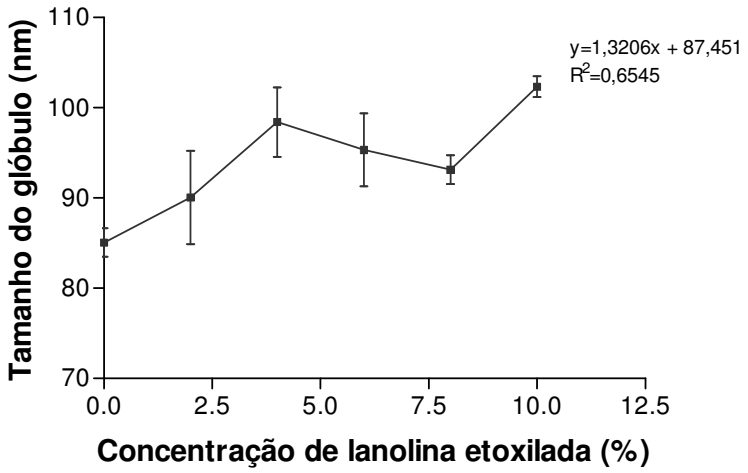



Figura 18: Tamanho de glóbulo em função da concentração de lanolina etoxilada.

A distribuição granulométrica dos glóbulos é uma maneira efetiva para estimar a estabilidade e o efeito da emulsificação nas emulsões (LI , *et al*., 2009). Nas concentrações de 0,0; 2,0% ; 4,0 % ; 6,0% e 8,0% e 10,0% de lanolina etoxilada (Figura 20 A, B, C, D e E, respectivamente) as formulações mostraram distribuição monomodal, indicando homogeneidade. Este fato pode ser devido à formação de uma estrutura bicontínua ou lamelar quando a água está sendo vertida na fase oleosa. Depois que essas estruturas passam do ponto de inversão decompõe em pequenos glóbulos de óleo, sendo essa decomposição facilitada pela baixa tensão interfacial do sistema no ponto de inversão de fases. A alta concentração de tensoativo permite a completa solubilização do óleo , no valor de temperatura próximo ao ponto de inversão proporcionando a formação de emulsões com distribuição monomodal (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Desta forma, a emulsificação é considerada a etapa de maior importância no processo de obtenção dos sistemas nanoemulsionados, sendo que, uma dispersão insuficiente pode resultar em glóbulos grandes com ampla distribuição (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005). A formulação composta por 10,0% de lanolina

etoxilada (Figura 19 F) apresentou pequena mudança na distribuição das partículas, caracterizada pelo aparecimento de um segundo pico de intensidade 2,3 %, indicando a existência de uma segunda população de glóbulos, que pode ter sido induzida por modificações no processo de emulsificação do sistema provocadas pela lanolina etoxilada (WHITBY *et al*.,2006). Porém, a intensidade do segundo pico é muito pequena, e a nanoemulsão apresenta baixo índice de polidispersividade (0,190) (Figura 20).

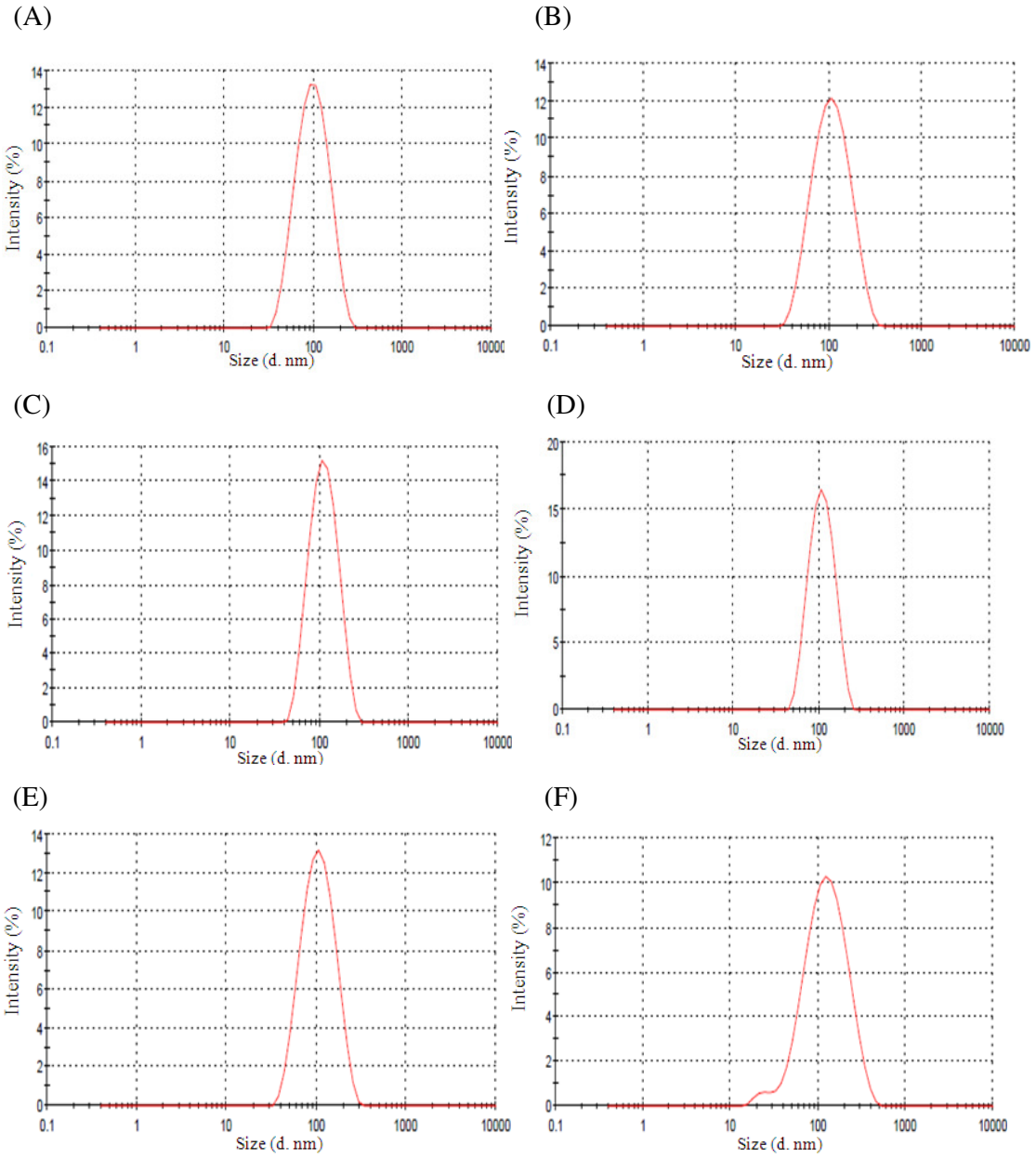



Figura 19: Distribuição granulométrica das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina etoxilada: (A) 0,0%, (B) 2,0%, (C) 4,0%, (D) 6,0%, (E) 8,0% e (F) 10,0%.

O índice de polidispersividade revela a qualidade da dispersão, variando de valores de 0,1 até 1,0. Medidas abaixo de 0,2 indicam uma pequena distribuição de tamanho enquanto, valores próximo de um, são obtidos para amostras com baixa qualidade, ou seja, para sistemas polidispersos (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007). O índice de polidispersividade não apresentou alterações estatisticamente significativas (p>0,05) com o aumento da concentração de lanolina (Figura 20), e manteve-se na faixa de 0,165- 0,190; indicando homogeneidade das formulações.

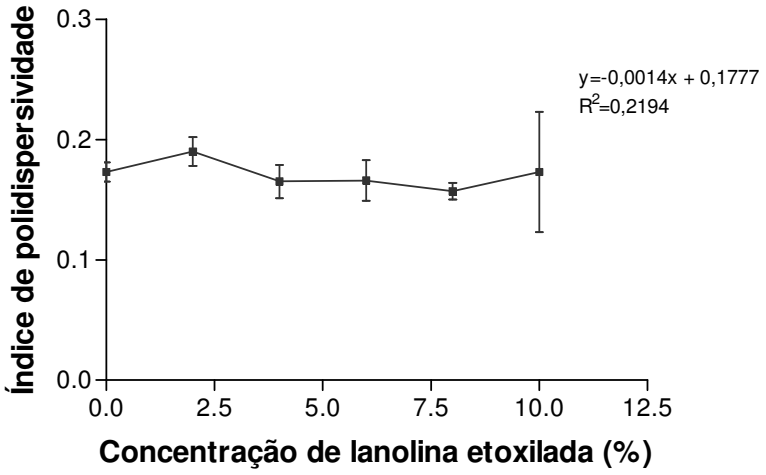



Figura 20: Índice de polidispersividade em função da concentração de lanolina etoxilada.

As nanoemulsões apresentaram valor de pH levemente ácido (4,6-5,8) compatível com o pH da pele (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002), não apresentando diferenças significativas (p>0,05) com o aumento da concentração de lanolina (Figura 21).

Esse resultado era esperado, uma vez que a solução 10,0% de lanolina etoxilada apresenta valor de pH de 5,2, não interferindo , desta forma, no valor de pH das nanoemulsões aditivadas.

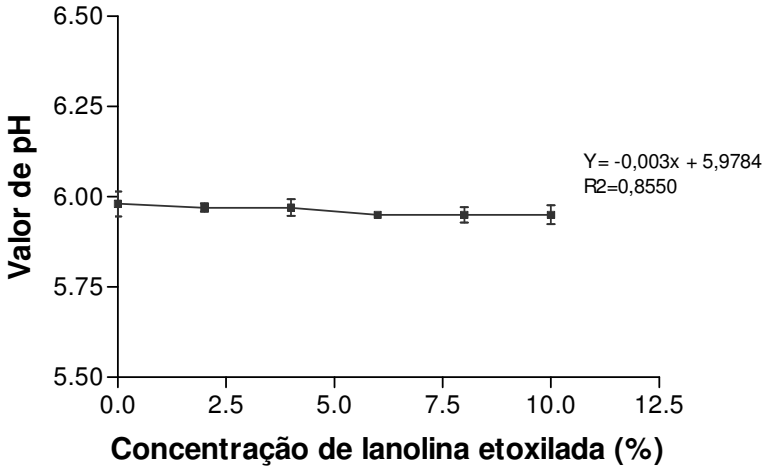



Figura 21: Valor de pH em função da concentração de lanolina etoxilada.

A condutividade das nanoemulsões mostrou-se dependente da concentração de lanolina (Figura 22) ($R^2$>0,9). O aumento da condutividade pode ser devido ao aumento de concentração de lanolina, uma substância hidrossolúvel com tendência a conduzir corrente elétrica.

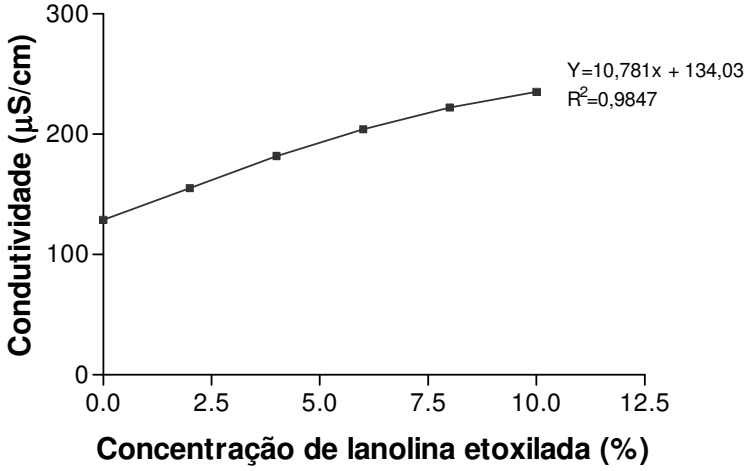



Figura 22: Condutividade elétrica em função da concentração de lanolina etoxilada.

As amostras com 2,0%, 4,0% e 6,0% mostraram-se estáveis frente ao teste de centrifugação, enquanto as amostras com 8,0% e 10,0% de lanolina apresentaram cremeação como fenômeno de instabilidade após o terceiro ciclo (Tabela 13). A lanolina etoxilada, em concentrações acima de 8,0% pode levar a uma solubilização do tensoativo, diminuindo a quantidade deste disponível para se adsorver na interface O/A, e ainda nessas concentrações, a

lanolina etoxilada pode não favorecer a completa solubilização da fase oleosa próximo ao ponto de inversão de fases, o que pode resultar em uma desestabilização do sistema.

Tabela 13: Nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada frente ao teste de centrifugação.

| Concentração (%) de lanolina etoxilada | 1º ciclo | 2º ciclo | 3º ciclo |
|---|---|---|---|
| 2,0 | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| 4,0 | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| 6,0 | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| 8,0 | ***NR*** | LM | LM |
| 10,0 | ***NR*** | LM | LM |

Dentre as formulações estáveis ( 2,0%, 4,0% e 6,0%) , a formulação com 6,0% de lanolina não apresentou o menor tamanho de glóbulos, porém seu tamanho (95,33nm) está dentro da faixa nanométrica e atende o objetivo cosmético, uma vez que incorpora alta quantidade de emoliente na formulação. Esta formulação mostrou-se estável quando submetida a testes de centrifugação e por isso foi considerada a mais adequada entre as formulações testadas para prosseguir com os testes.

5.4.2 Influência da lanolina acetilada:

A nanoemulsão obtida previamente (formulação 7 composta por $T_{MOS}/T_{36OE}$) foi aditivada com lanolina acetilada nas concentrações de 1,0 a 5,0%. Na concentração de 5,0% de lanolina apresentou cremeação após 24 horas de preparo sendo portanto, considerada instável e não foi submetida aos testes posteriores. Foi observado, ao contrário do derivado etoxilado (figura 18) a existência de uma relação linear entre o aumento do tamanho do glóbulo e o aumento da concentração de lanolina acetilada (Figura 23) ($R^2 > 0,99$).

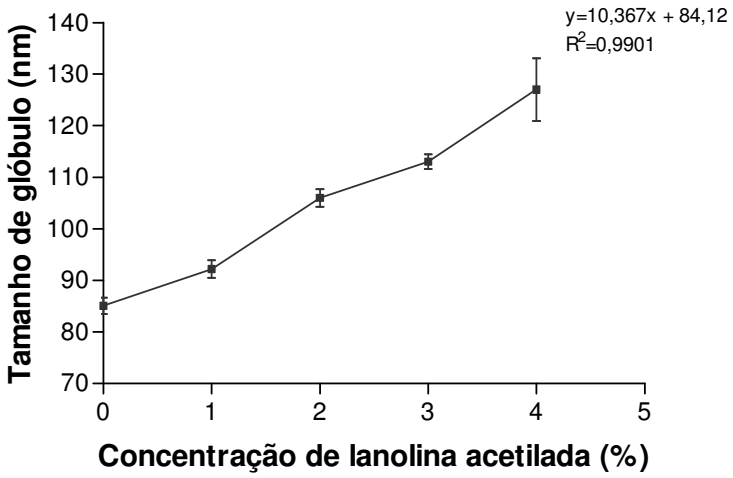



Figura 23: Tamanho do glóbulo em função da concentração de lanolina acetilada.

A lanolina acetilada é uma substância lipofílica, que além de emoliente possui também a função de solubilizante podendo solubilizar o tensoativo. É sabido que a diminuição da concentração deste resulta em um aumento do tamanho dos glóbulos (TADROS *et al.,* 2004). A presença de lanolina poderia retirar algumas moléculas de tensoativo da interface O/A levando a diminuição da concentração de tensoativos.

Além deste efeito solubilizante a lanolina é formada por ésteres de cadeia carbônica longa, maior do que as cadeias carbônicas dos ácidos graxos presentes nos óleos (ácido oléico, linoléico e linolênico, ambos formados por uma cadeia carbônica $C_{18}$) e nos tensoativos , $T_{MOS}$ (C-24) e T36OE (C-57). Sabe-se que na formação de nanoemulsões O/A, as moléculas de ácidos graxos presentes no óleo juntamente com os tensoativos organizam- se no glóbulo oleoso e ao redor deste por afinidade, sendo que a cadeia carbônica de natureza lipofílica está posicionada no interior do glóbulo e, a porção carboxila dos ácidos e os grupos de óxido de etileno dos tensoativos, direcionados para a fase aquosa. É provável que o mesmo ocorra com a lanolina, onde a parte apolar está direcionada para o interior do glóbulo e, os grupos de óxido de etileno (lanolina etoxilada) e o grupo acetil (lanolina acetilada) direcionados para a fase aquosa devido à polaridade. Como a cadeia carbônica da lanolina é maior do que a dos ácidos graxos e tensoativos, posicionada no interior do glóbulo, pode provocar aumento do mesmo (Figura 24).

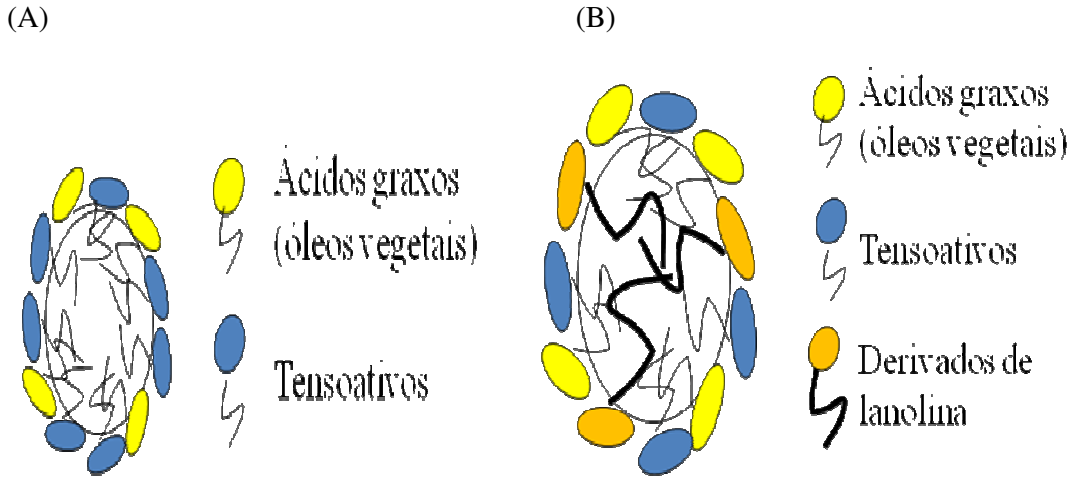



Figura 24: Influência dos derivados de lanolina no tamanho dos glóbulos da nanoemulsão (A) nanoemulsão não aditivada e (B) nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina (etoxilada ou acetilada).

O aumento mais pronunciado dos glóbulos da nanoemulsão aditivada de lanolina acetilada quando comparado aos sistemas aditivados de lanolina etoxilada, pode estar relacionada à maior estabilidade dos sistemas que contêm o derivado etoxilado em razão do impedimento estérico causado pelas pontes de hidrogênio formadas pelos grupos de óxido de etileno, juntamente com as pontes de hidrogênio dos tensoativos, inibindo os choques entre os glóbulos e, consequentemente impedindo a coalescência (MORAIS *et al.*, 2008).

A distribuição granulométrica das formulações, não aditivada e aditivada de lanolina acetilada estão descritas na Figura 25. As nanoemulsões adicionadas com 1,0% (Figura 25 B) e 4,0% (Figura 25 E) de lanolina acetilada mostraram distribuição monomodal, enquanto nas nanoemulsões com 2,0% (Figura 25 C) e 3,0%( Figura 25 D) houve o aparecimento de uma segunda população de glóbulos. Como dito anteriormente, a etapa de emulsificação é a mais importante no processo de obtenção de sistemas dispersos e a alta concentração de tensoativo permite a completa solubilização do óleo próximo ao ponto de inversão, proporcionando a formação de emulsões com distribuição monomodal. Neste caso, a possível solubilização e diminuição da concentração do tensoativo pela lanolina acetilada provavelmente causou a formação de glóbulos maiores com distribuição granulométrica heterogênea (bimodal). Esta variação, porém, na distribuição granulométrica é muito pequena, correspondendo a uma segunda população de intensidade de 4,0% e glóbulos de 30,9 nm para a formulação com 2,0% de lanolina acetilada (Figura 25 C) e 0,0% para a formulação com 3,0% de lanolina acetilada (Figura 25 D).

O aumento no tamanho de glóbulos e as alterações na distribuição granulométrica das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada podem estar relacionados também a outros fatores como valor de EHL e tensão interfacial do sistema, que serão discutidos posteriormente.

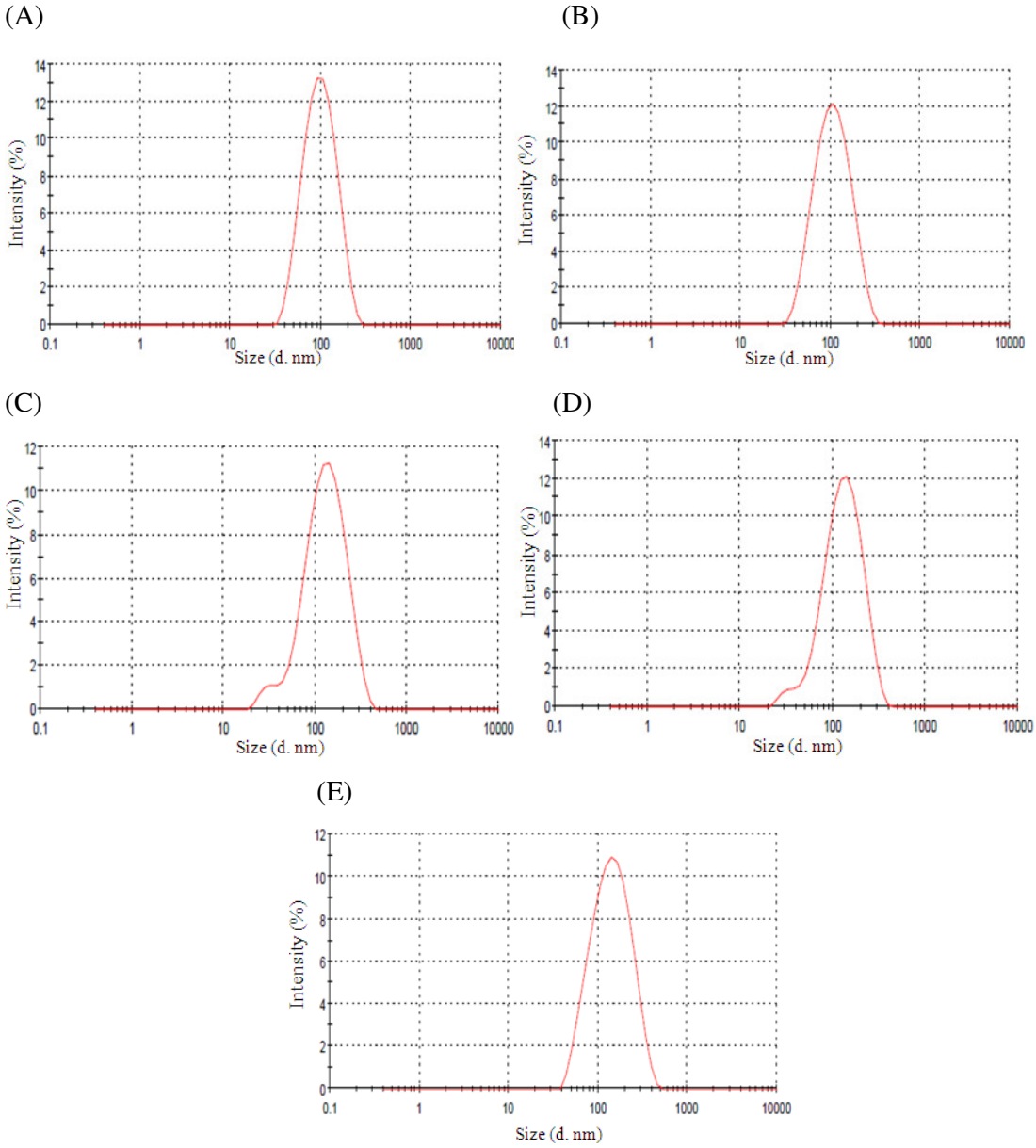



Figura 25: Distribuição granulométrica das nanoemulsões, não aditivada e aditivada de lanolina acetilada: (A) 0,0%, (B) 1,0%, (C) 2,0%, (D) 3,0% e (E) 4,0%.

As nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada (1,0- 4,0%) tiveram índices de polidispersividade próximos de 0,2, que corresponde a um sistema homogêneo (aceitável)

(Figura 26). Porém, os mesmos mostraram-se superiores aos índices das nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada. Supomos que este aumento esteja relacionado ao aumento no tamanho dos glóbulos muito maior para as formulações aditivadas de lanolina acetilada do que para as aditivadas de lanolina etoxilada.

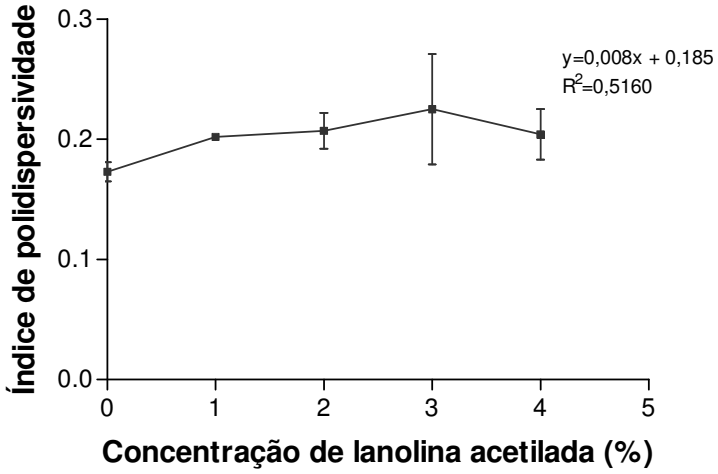



Figura 26: Índice de polidispersividade em função da concentração de lanolina acetilada.

A condutividade elétrica não apresenta dependência linear com a concentração de lanolina acetilada (Figura 27), apesar de demonstrar uma tendência de diminuição com relação ao aumento da concentração. Essa tendência era esperada, uma vez que uma maior quantidade de lanolina lipossolúvel diminui a tendência da emulsão em conduzir corrente elétrica devido ao aumento de material lipossolúvel no meio.

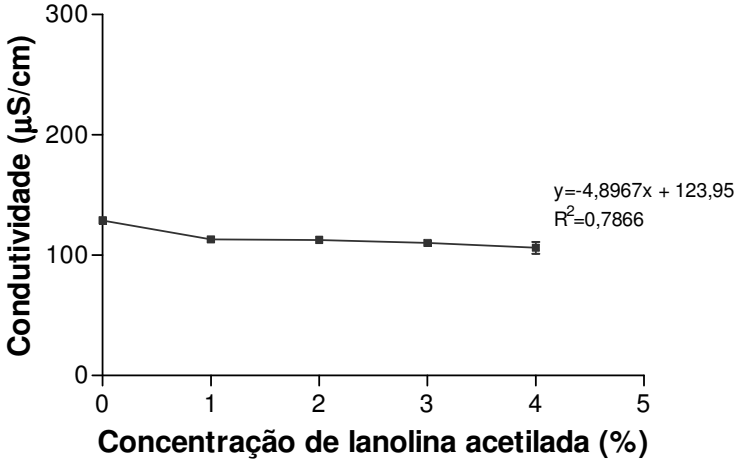



Figura 27: Condutividade em função da concentração de lanolina acetilada.

Não há relação entre os valores de pH das formulações e o aumento da concentração de lanolina acetilada (Figura 28).

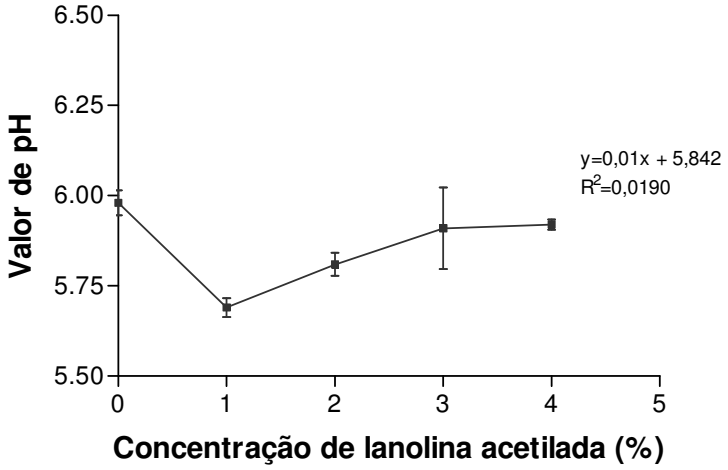



Figura 28: Valor de pH em função da concentração de lanolina acetilada.

Frente ao teste de centrifugação, as nanoemulsões compostas por 1,0% e 2,0% de lanolina acetilada permaneceram estáveis ao fim do 3° ciclo. As nanoemulsões compostas por 3,0% e 4,0% apresentaram-se levemente modificadas, não sendo consideradas estáveis (Tabela 14). A lanolina acetilada, em concentrações acima de 3,0% parece interferir no processo de emulsificação, podendo solubilizar o tensoativo, levando a uma diminuição da quantidade deste disponível para se adsorver na interface, e mesmo solubilizar completamente a fase oleosa próximo ao ponto de inversão de fases, o que pode resultar em uma desestabilização do sistema.

Tabela 14 : Nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada frente ao teste de centrifugação.

| Concentração (%) de lanolina acetilada | 1º ciclo | 2º ciclo | 3º ciclo |
|---|---|---|---|
| 1,0 | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| 2,0 | ***NR*** | ***NR*** | ***NR*** |
| 3,0 | ***NR*** | LM | LM |
| 4,0 | ***NR*** | LM | LM |

A formulação composta por 2,0% de lanolina acetilada foi considerada a mais adequada para dar sequência aos testes, pois se apresentou estável ao fim do teste de centrifugação e, embora não apresente o menor tamanho de glóbulos, permanece na faixa nanométrica e atende o objetivo cosmético, uma vez que incorpora quantidade razoável de emoliente na formulação.

5.5 Avaliação da influência dos derivados de lanolina no EHL das nanoemulsões:

Diante do exposto acima, onde observou-se que a adição de lanolina tanto etoxilada quanto acetilada provoca um aumento no tamanho dos glóbulos da nanoemulsão, sendo esse aumento mais pronunciado para a adição de lanolina acetilada. Portanto, o estudo do valor de EHL das formulações fez-se necessário, uma vez que a lanolina é composta por ésteres, poliésteres, alcoóis de cadeia longa e ácidos graxos, podendo assim interferir no equilíbrio hidrofílico-lipofílico da formulação. Como foi visto, os derivados de lanolina utilizados neste estudo diferem entre si em relação à solubilidade, sendo a lanolina etoxilada mais solúvel. O valor de EHL foi determinado com o par de tensoativos $T_{MOS}/T_{36OE}$, que resultou em formulações estáveis na determinação do EHL da fase oleosa realizado previamente. A composição das formulações pode ser visualizada pela Tabela 15.

Tabela 15: Composição das formulações para a determinação do EHL.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Fase oleosa* | 10,0% | Fase oleosa* | 10% |
| Tensoativo lipofílico ($T_{MOS}$)<br>Tensoativo hidrofílico ($T_{36OE}$) | 5,0% | Tensoativo lipofílico ($T_{MOS}$)<br>Tensoativo hidrofílico ($T_{36OE}$) | 5,0% |
| Lanolina etoxilada | 6,0% | Lanolina etoxilada | 2,0% |
| Água destilada | 74,0% | Água destilada | 78,0% |

(*) Fase oleosa composta por óleo de framboesa, maracujá e pêssego.

Segundo Zhang; Que, (2008), o EHL ótimo é aquele onde o sistema possui estabilidade máxima, apresentando glóbulos de menor tamanho. Os sistemas nanoemulsionados aditivados de lanolina etoxilada apresentaram estabilidade máxima nos valores de EHL iguais a 8,0 e 9,0, (Tabela 16), permanecendo sem sinais de instabilidade ao fim do teste de centrifugação, com tamanho de glóbulos de 181,0 nm e 172,0 nm, respectivamente. Deste modo, o valor de EHL ótimo do sistema é igual a 9,0, não havendo alteração com a adição de lanolina etoxilada, quanto ao valor determinado incialmente.

Tabela 16: Avaliação macroscópica das nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada após 24 horas de preparo para a determinação do valor de EHL da formulação.

| EHL | $T_{MOS}/T_{36OE}$ |
|---|---|
| 4,3 | Separação |
| 5,0 | Separação |
| 6,0 | Separação |
| 7,0 | Cremeação |
| 8,0 | ***Normal*** |
| 9,0 | ***Normal*** |
| 10,0 | Cremeação |
| 11,0 | Cremeação |
| 12,0 | Separação |

Os sistemas nanoemulsionados aditivados de lanolina acetilada apresentaram estabilidade máxima nos valores de EHL de 8,0; 9,0; e 10,0 (Tabela 17). Porém, após o teste de centrifugação a formulação de EHL 10,0 mostrou -se cremeada. O tamanho de glóbulos das nanoemulsões no valor de EHL 8,0 e 9,0 foi de 209,0 nm e 187,0 nm, respectivamente, sendo, portanto o valor de EHL ótimo para as nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada igual a 9,0, não havendo alteração quanto ao valor inicial.

Tabela 17: Avaliação macroscópica das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada após 24 horas de preparo para a determinação do EHL da formulação.

| EHL | $T_{MOS}/T_{36OE}$ |
|---|---|
| 4,3 | Separação |
| 5,0 | Separação |
| 6,0 | Separação |
| 7,0 | Cremeação |
| 8,0 | ***Normal*** |
| 9,0 | ***Normal*** |
| 10,0 | ***Normal*** |
| 11,0 | Cremeação |
| 12,0 | Separação |

## 5.6 Influência dos derivados de lanolina na tensão interfacial das nanoemulsões:

Para obter emulsões estáveis, a combinação de tensoativos que se adsorvem na interface, entre a fase aquosa e oleosa são usados. A função desses tensoativos é diminuir a tensão e a viscosidade interfacial. Segundo a teoria da tensão interfacial, os tensoativos se adsorvem na interface entre os líquidos, diminuindo a tensão interfacial, portanto, quanto menor a tensão interfacial, maior a adsorção de tensoativos. Essa significante diminuição da tensão interfacial é importante para a formação de nanoemulsões, ou seja, a uma baixa tensão interfacial, ocorre a emulsificação, levando a formação de nanoglóbulos (SAJJADI, 2006; SPINELLI, 2010).

Deste modo,a tensão interfacial da nanoemulsão não aditivada e aditivada de derivados de lanolina foi determinada. Segundo Stamkulov *et al.*, (2009) a tensão interfacial entre água e óleo se encontra ao redor de 30-35 $mN.m^{-1}$.A fim de favorecer a emulsificação do sistema, tensoativos são adicionados, reduzindo a tensão interfacial para 1-5 $mN.m^{-1}$. Como pode ser visualizado pelas Figuras 29 e 30, as nanoemulsões, tanto não aditivada quanto aditivada de derivados de lanolina apresentam valores de tensão interfacial muito menores que o valor relatado por Stamkulov et al., (2009), provavelmente pela alta concentração de tensoativos nas nanoemulsões que levaram a formação de glóbulos nanométricos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) com o aumento da concentração de lanolina tanto etoxilada quanto acetilada, embora possa ser observado um pequeno aumento da tensão interfacial com o aumento da concentração de lanolina etoxilada (Figura 29) e uma diminuição da tensão com o aumento da concentração de lanolina acetilada (Figura 30. Yang; Cho; Park, (2009) avaliaram a influência do etanol na tensão interfacial e tamanho dos glóbulos de nanoemulsões e observaram que o etanol diminui a tensão interfacial do sistema, porém, há um aumento do tamanho de glóbulos. Segundo esses pesquisadores, o aumento do tamanho dos glóbulos é o aumento da densidade da fase contínua e não a alteração da tensão interfacial do sistema.

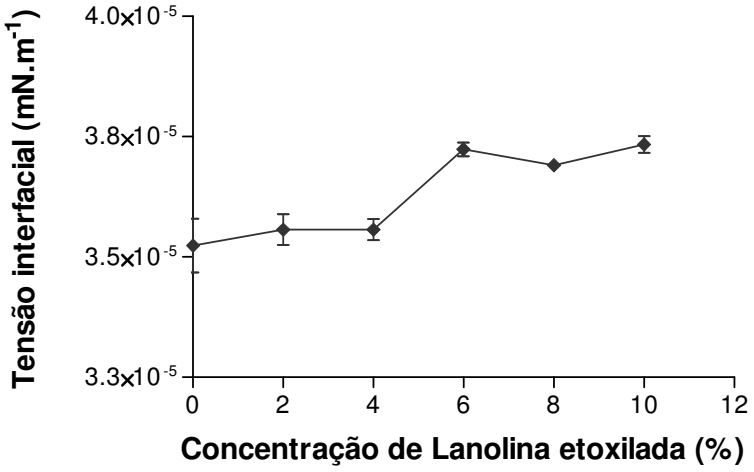



Figura 29: Tensão interfacial das nanoemulsões em função da concentração de lanolina etoxilada.

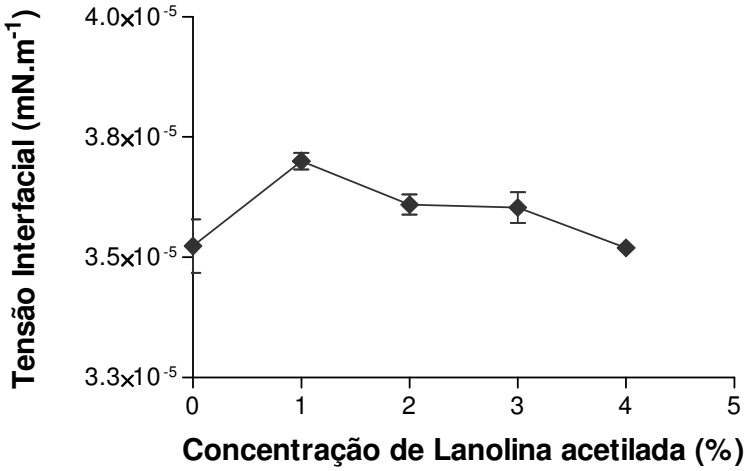



Figura 30: Tensão interfacial das nanoemulsões em função da concentração de lanolina acetilada.

Como a variação da tensão interfacial neste estudo não foi significativa, o aumento do tamanho dos glóbulos provavelmente está relacionado ao efeito solubilizante da lanolina e sua possível interferência no processo de emulsificação, como exposto anteriormente.

5.7 Estabilidade preliminar da formulação aditivada de lanolina etoxilada:

- Estresse térmico:

A nanoemulsão aditivada de lanolina acetilada permaneceu sem sinais de instabilidade até a temperatura de 60°C, sendo considerada estável mediante o teste de

estabilidade preliminar, uma vez que a temperatura máxima preconizada pela ANVISA é de 50°C.

5.8 Estabilidade acelerada das formulações aditivadas de lanolina etoxilada:

A formulação aditivada de lanolina etoxilada considerada adequada para dar prosseguimento nos testes de estabilidade foi à formulação n° 7 composta por $T_{MOS}/T_{36OE}$ e lanolina etoxilada na concentração de 6,0%.

Para ser considerada apropriada para uso cosmético/farmacêutico a emulsão precisa classificar-se de acordo com alguns critérios, como estabilidade prolongada sob condições variadas de armazenamento (THADROS *et al*., 2004). O estudo de estabilidade acelerada é preditivo e serve como auxiliar para a determinação do prazo de validade do produto (ANVISA,2004).

Medidas do tamanho dos glóbulos após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem indicação sobre a estabilidade do sistema: quanto mais rápido os glóbulos aumentam de tamanho, menor a estabilidade do sistema (JEONG, OH, KIM, 2001; KULMYRZAEV, SCHUBERT, 2003; ROLAND *et al*., 2003).

O tamanho dos glóbulos em função do tempo (90 dias) não apresentou alterações estatisticamente significativas (p>0,05) em nenhuma das condições de temperatura a que as nanoemulsões foram submetidas (25 ± 2°C, 50 ± 2 °C e 5 ± 2°C)(Figura 31), o que demonstra a estabilidade da formulação frente a este parâmetro.

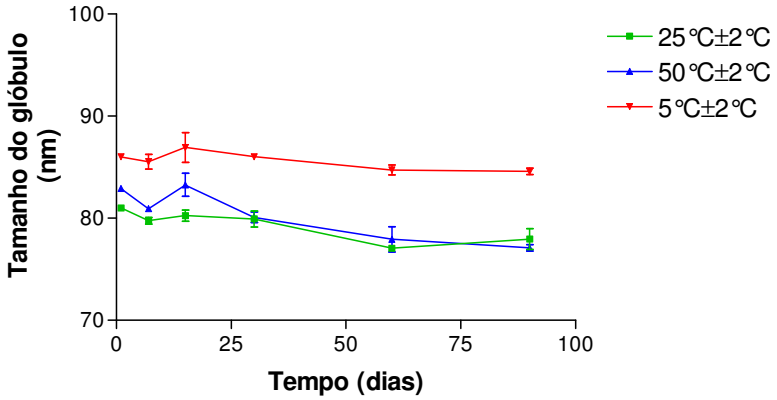
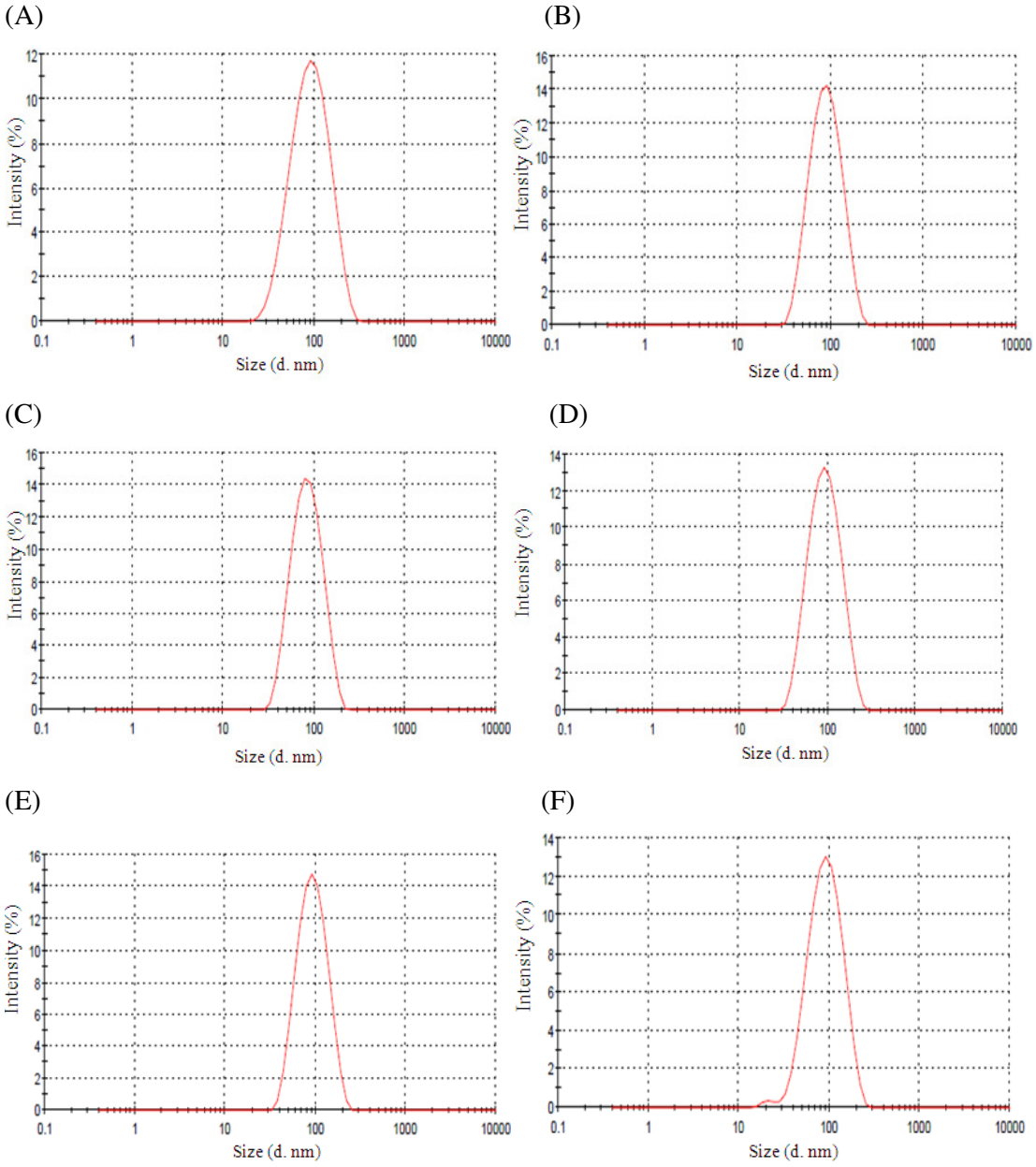



Figura 31: Tamanho do glóbulo das nanoemulsões em função do tempo.

A análise da distribuição granulométrica das formulações mostra que não houve alteração, ou seja, as amostras permaneceram com distribuição monomodal em todas as

temperaturas a que foram submetidas (25±2°C, 50±2°C e 5±2°C) ao longo do teste de estabilidade acelerada para as nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada (Figura 32).



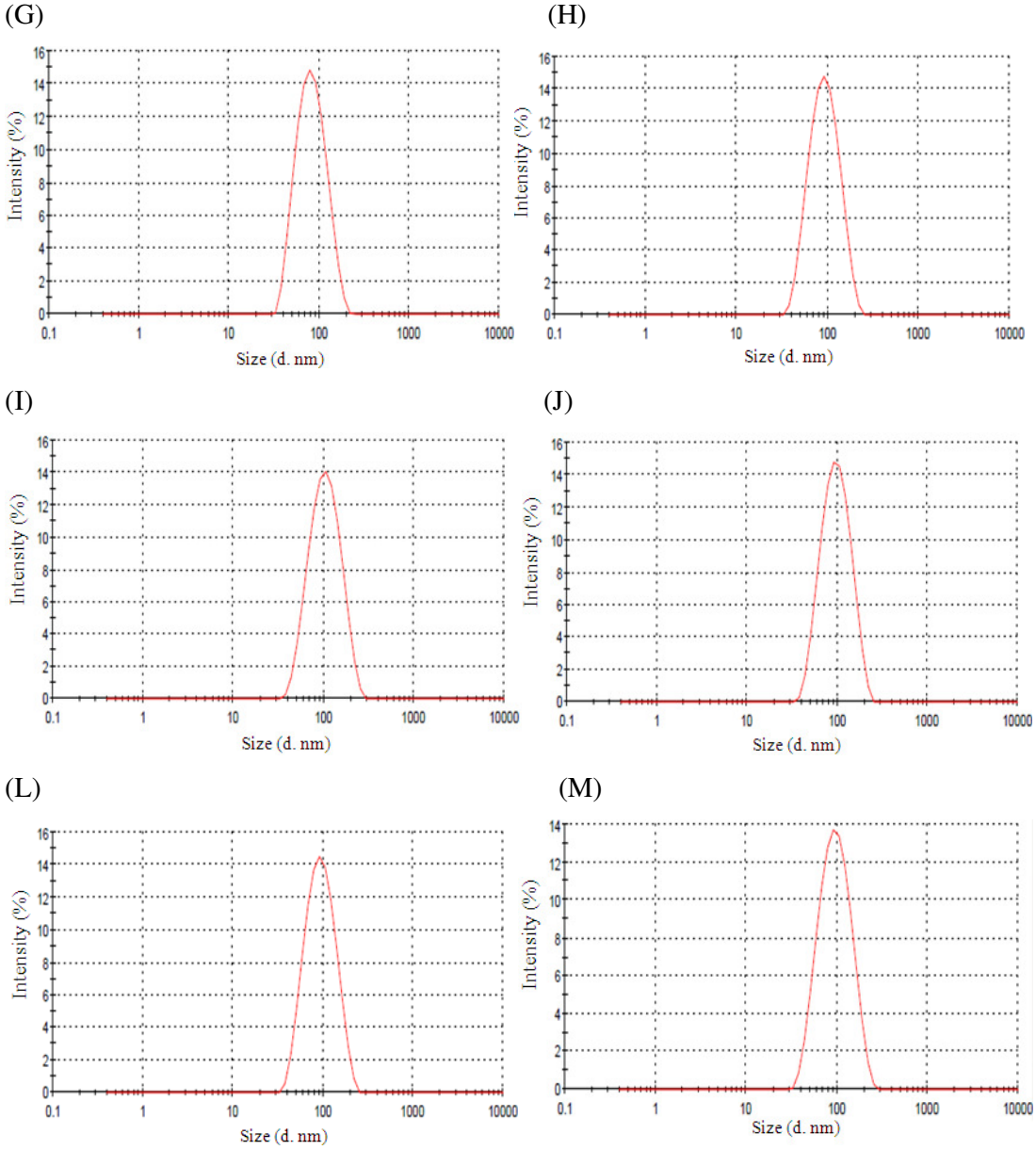



Figura 32: Distribuição granulométrica dos glóbulos das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina etoxilada submetidas à estabilidade acelerada: (A) Controle 24 horas, (B) Controle 30 dias, (C) Controle 60 dias, (D) Controle 90 dias (E) Estufa 24 horas, (F) Estufa 30 dias, (G) Estufa 60 dias, (H) Estufa 90 dias, (I) Refrigerador 24 horas, (J) Refrigerador 30 dias, (L) Refrigerador 60 dias e (M) Refrigerador 90 dias.

A variação da condutividade em função do tempo também foi avaliada em nanoemulsões armazenadas em diferentes temperaturas, apresentando aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) quando as formulações foram expostas á temperatura de 50± 2°C , a partir do 60° dia de armazenamento. (Figura 33). Segundo Anvisa, (2004), o aumento da condutividade pode estar relacionado à coalescência dos glóbulos, porém, neste caso podemos observar que o tamanho dos glóbulos não sofreu aumento estatisticamente

significativo com o tempo, sugerindo que não houve coalescência dos glóbulos. Masmoudi *et al.* (2005) relataram que é difícil avaliar a estabilidade de emulsões somente pela condutividade elétrica, porque não há uma relação linear entre o aumento da condutividade e o fenômeno de instabilidade.

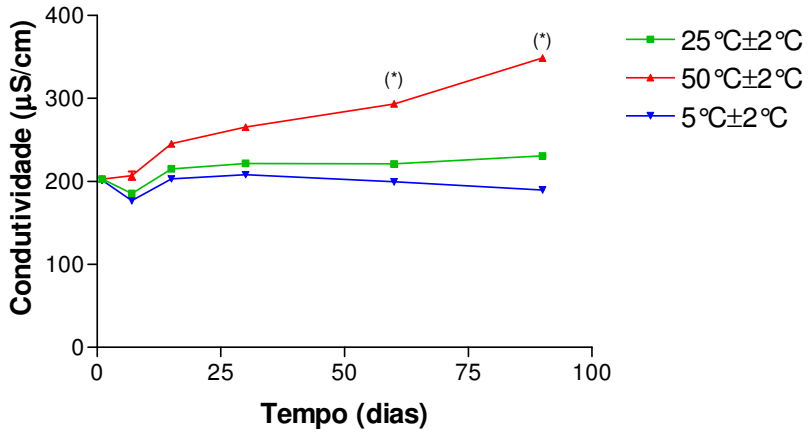



Figura 33: Condutividade elétrica das nanoemulsões em função do tempo.

Segundo ANVISA (2004), a determinação da faixa de pH de uma formulação deve contemplar os aspectos de estabilidade dos ingredientes, segurança e eficácia do produto. As nanoemulsões apresentaram valor de pH compatível com a pele, ou seja, levemente ácido (4,6-5,8) (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). Quando submetidas ao teste de estabilidade, a valor de pH das amostras (Figura 34) apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) quando armazenadas a 50 ± 2°C a partir do 69° dia de armazenamento . Segundo Masmoudi *et al.* (2005) a diminuição do valor de pH pode representar uma oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos ou mesmo a hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos, sendo que os ácidos graxos livres reduzem o pH da formulação . Na avaliação das características organoléptica das nanoemulsões, não houve alteração na cor e odor das formulações armazenadas a 5± 2°C, 25 ± 2°C, sendo que essas características apresentaram modificações a partir do 60° dia quando armazenadas a 50 ± 2°C. Segundo Ramalho, (2006) as reações oxidativas são responsáveis pelo desenvolvimento de odores desagradáveis e outras alterações que comprometem a integridade e segurança dos produtos, tornando-os impróprios e fatores como incidência de luz, temperaturas elevadas podem acelerar o processo de oxidação.

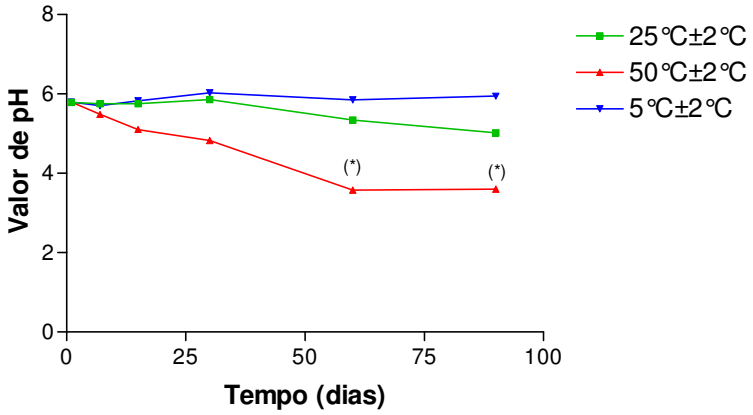



Figura 34: Valor de pH das nanoemulsões em função do tempo.

No caso das emulsões estudas os óleos vegetais, por terem atividade antioxidante comprovada podem retardar esse processo, porém um agente antioxidante sintético deve ser adicionado a formulação para evitar o processo de oxidação.

5.9 Estabilidade preliminar das formulações aditivadas de lanolina acetilada:

- Estresse térmico:

A nanoemulsão aditivada de lanolina acetilada permaneceu sem sinais de instabilidade até a temperatura de 60°C, sendo considerada estável mediante o teste de estabilidade preliminar, uma vez que a temperatura máxima preconizada pela ANVISA é de 50°C.

5.10 Estabilidade acelerada das formulações aditivadas de lanolina acetilada:

A formulação aditivada de lanolina acetilada escolhida para dar prosseguimento nos estes de estabilidade foi à formulação n° 7 composta por $T_{MOS}/T_{36OE}$ e lanolina etoxilada na concentração de 2%.

O tamanho do glóbulo em função do tempo mostrou um aumento estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando as nanoemulsões foram armazenadas a 50± 2°C, anão apresentando alterações no tamanho quando essas nanoemulsões foram armazenadas a 5±2°C (Figura 35). Não No entanto, quando as nanoemulsões foram armazenadas a 25± 2°C, houve um aumento seguido da diminuição no tamanho dos glóbulos. Neste caso, o aumento do tamanho dos glóbulos pode ter ocorrido devido a fenômenos de instabilidade reversíveis, como a floculação, enquanto não ocorreu solubilização completa do óleo no tensoativo, pois

segundo Solans *et al*., (2005), nanoemulsões com tamanho de glóbulos reduzidos são alcançados após completa solubilização da fase oleosa.

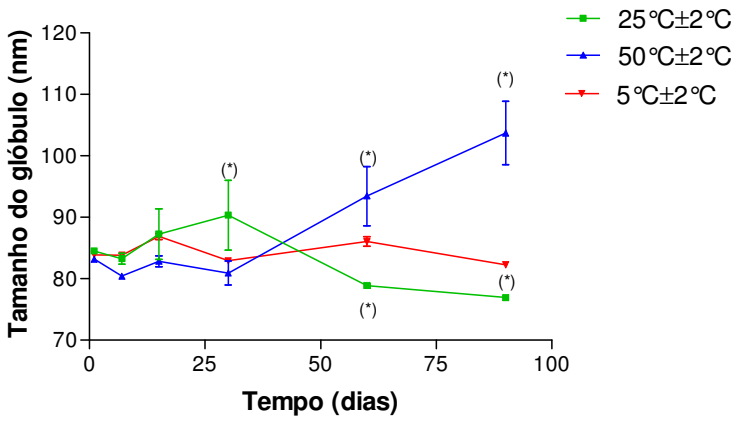
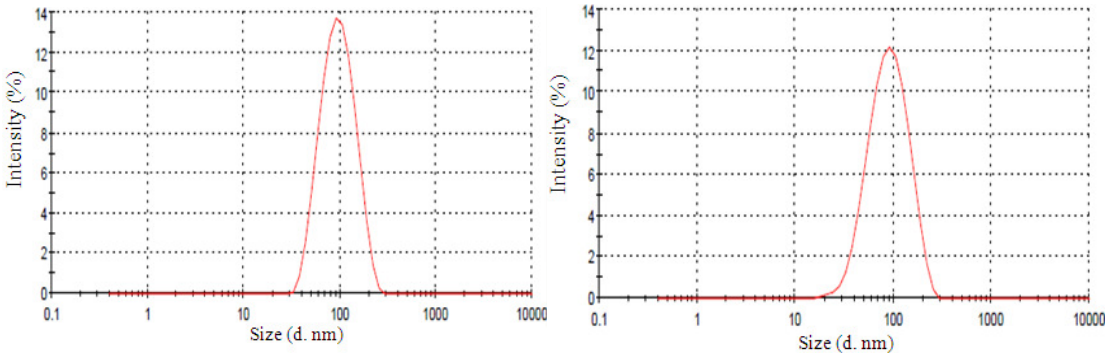


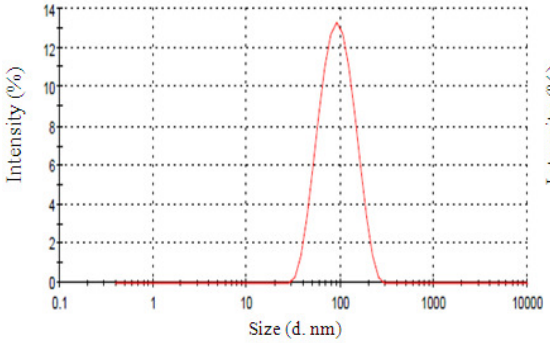

Figura 35: Tamanho do glóbulo das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo.

A análise granulométrica das formulações nos permite observar que as diferentes temperaturas de armazenamento a que as nanoemulsões foram submetidas não provocaram alterações na distribuição granulométrica das mesmas, embora tenha levado a um aumento do tamanho dos glóbulos quando esses sistemas foram submetidos a altas temperaturas (50±2°C), permanecendo a distribuição monomodal ao fim do teste em todas as condições de armazemamento (25±2°C, e 5±2°C) (Figura 36).

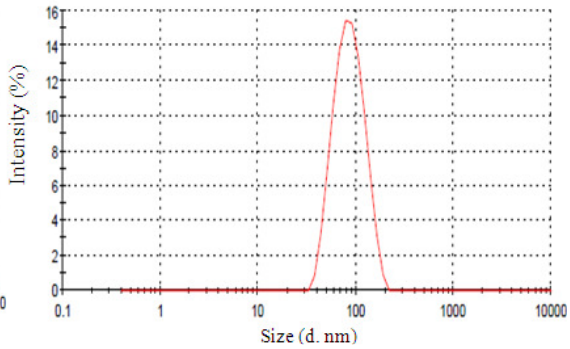
(A) (B)



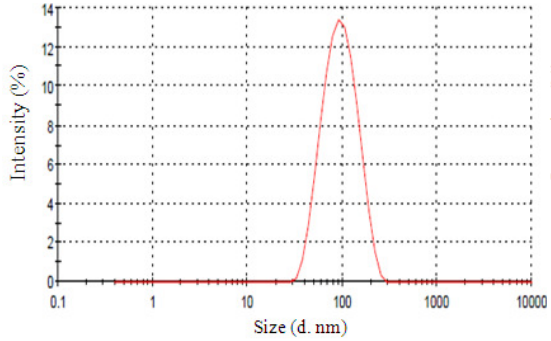
(C)


Intensity (%)
Size (d. nm)

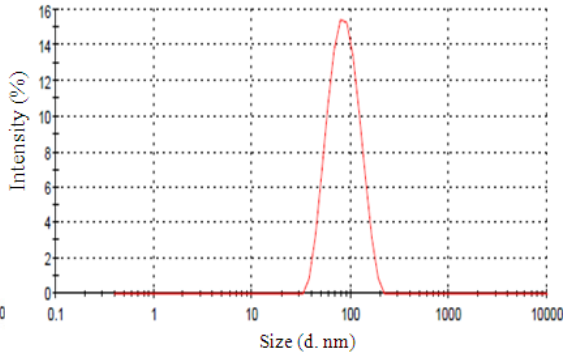
(D)


Intensity (%)
Size (d. nm)

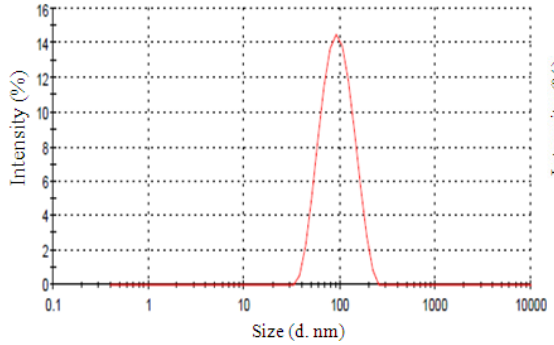
(E)


Intensity (%)
Size (d. nm)

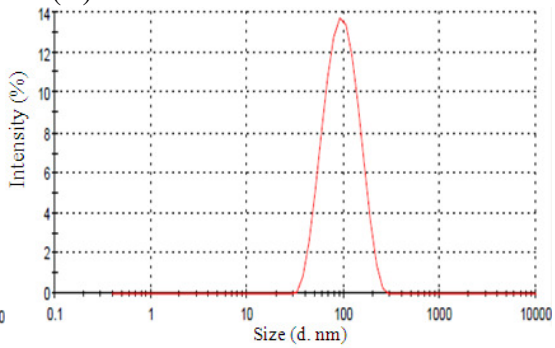
(F)


Intensity (%)
Size (d. nm)

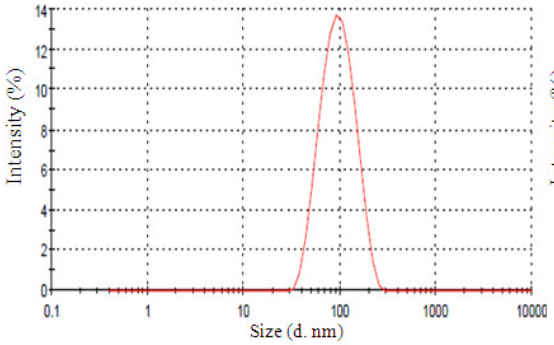
(G)


Intensity (%)
Size (d. nm)

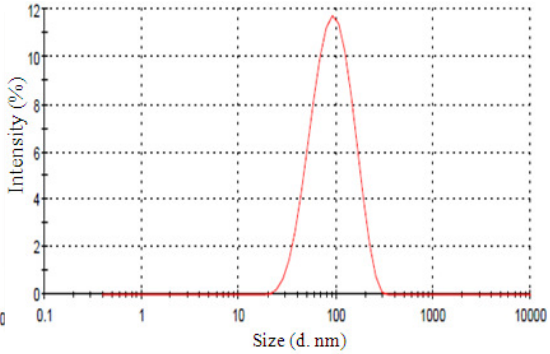
(H)


Intensity (%)
Size (d. nm)

(I)


Intensity (%)
Size (d. nm)

(J)


Intensity (%)
Size (d. nm)

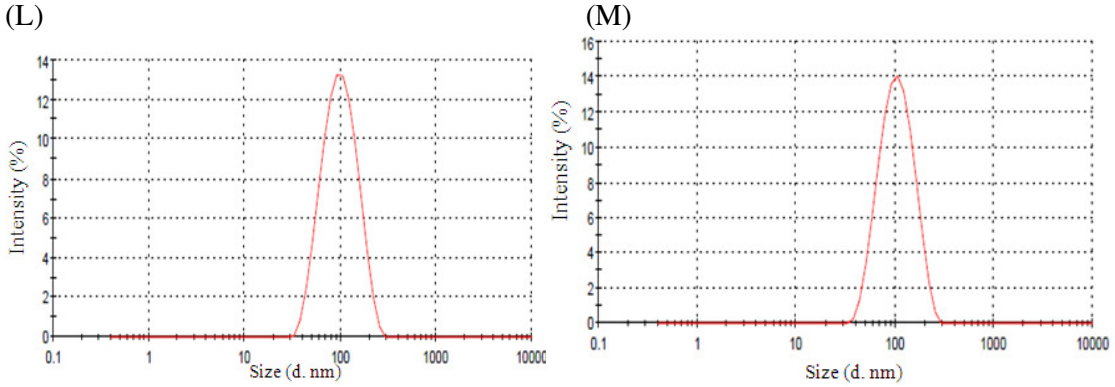



Figura 36: Distribuição granulométrica dos glóbulos das nanoemulsões não aditivada e aditivada de lanolina acetilada submetidas à estabilidade acelerada: (A) Controle 24 horas, (B) Controle 30 dias, (C) Controle 60 dias, (D) Controle 90 dias (E) Estufa 24 horas, (F) Estufa 30 dias, (G) Estufa 60 dias, (H) Estufa 90 dias, (I) Refrigerador 24 horas, (J) Refrigerador 30 dias, (L) Refrigerador 60 dias e (M) Refrigerador 90 dias.

Em sistemas que não estão em equilíbrio, as emulsões tendem a reduzir a área interfacial e a energia livre através de vários processos de instabilidade como floculação, cremeação, Ostwald ripening e coalescência (THADROS *et al.*,2004).Comparada com as emulsões convencionais, as nanoemulsões possuem boa estabilidade contra cremeação e floculação devido o pequeno diâmetro de seus glóbulos (THADROS *et al.*, 2004; CAPÈK, 2004) e Ostwald ripening e coalescência são os principais fenômenos de instabilidade observados em sistemas nanoemulsionados (PENG *et al.*, 2010) de modo que Ostwald ripening é dado pela relação linear entre o raio ao cubo do glóbulo pelo tempo (TADROS, IZQUIEDRO, SOLANS; 2004, PENG *et al.*, 2010). Nas nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada, não foi observada linearidade entre o raio ao cubo e o tempo quando esses sistemas foram armazenados a 5 °± 2°C, e 50± 2°C (Figura 37). Porém, quando as nanoemulsões foram armazenadas a 25± 2°C, uma boa correlação linear entre o $r^3$ e o tempo foi obtida com R>0,8, porém não houve aumento no tamanho do glóbulo, indicando que não ocorreu fenômeno de Ostwald ripening.

Nas nanoemulsões armazenadas 50± 2°C o aumento do tamanho dos glóbulos ocorreu provavelmente devido à coalescência dos glóbulos (PENG *et al.*, 2010), uma vez que nessa temperatura não houve uma boa relação do $r^3$ com o tempo. Segundo Aulton (2005), o aumento da temperatura pode ocasionar um aumento da velocidade de cremeação, devido à diminuição da viscosidade aparente da fase contínua, bem como ocasionar o aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa quanto do agente emulsionante na interface da

emulsão, favorecendo a coalescência. Por outro lado, baixas temperaturas podem romper o filme interfacial, levando a coalescência dos glóbulos.

As nanoemulsões aditivadas de lanolina etoxilada parecem mais estáveis em relação a variação no tamanho dos glóbulos que as nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada. Este fato pode estar relacionado a estabilização desses sistemas. Sabe-se que a estabilização de emulsões O/A por tensoativos não-iônicos ocorre por impedimento estérico e formação de pontes de hidrogênio, onde os grupos de óxido de etileno que estão na fase aquosa inibem o choque entre os glóbulos, impedindo a coalescência dos mesmos e o aumento da concentração de tensoativo pode formar um filme mais compacto reduzindo ainda mais a taxa de coalescência (MORAIS *et al.*,2008). A lanolina etoxilada possui uma cadeia de 75 mols de oxido de etileno, que pode favorece a estabilidade do sistema, pelo mesmo mecanismo dos tensoativos não-iônicos, levando a uma maior estabilidade desses sistemas além do baixo índice de polidispersividade que as nanoemulsões possuem, quando comparados com as nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada.

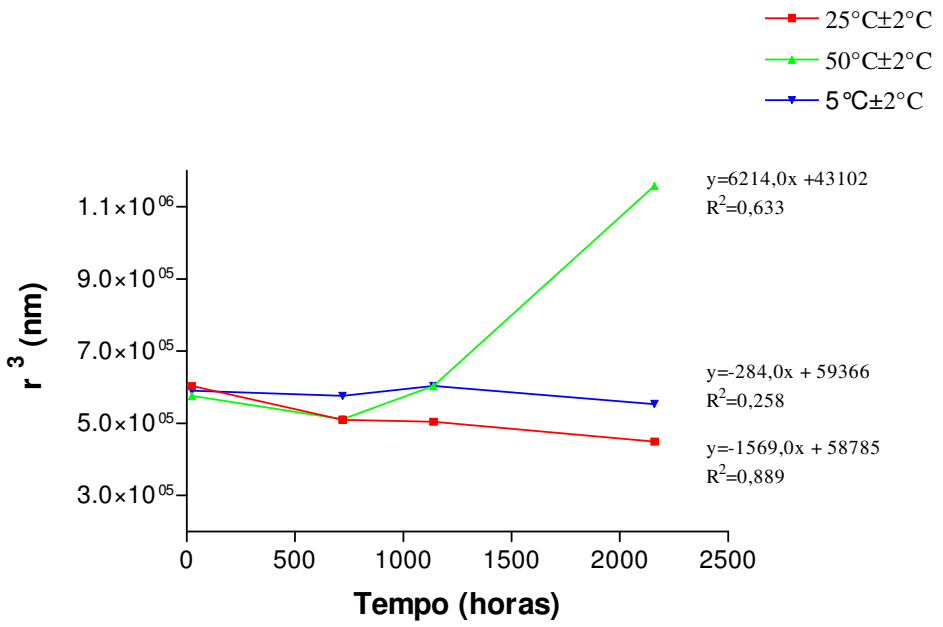



Figura 37: Raio ao cubo em função do tempo das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em diferentes temperaturas de armazenamento.

Desta forma, o principal fenômeno de instabilidade observado nas nanoemulsões quando essas são armazenadas a altas temperaturas é a coalescência, que levou a um aumento dos glóbulos nos sistemas aditivados de lanolina acetilada, uma vez que a baixas temperaturas, não foi observado aumento no tamanho dos glóbulos.

A condutividade (Figura 38) apresentou alterações estatisticamente significativas ($p<0,05$) em todas as temperaturas de armazenamento, mostrando-se mais acentuado a altas temperaturas (50±2°C) , podendo ser resultado da coalescência dos glóbulos (ANVISA, 2004).

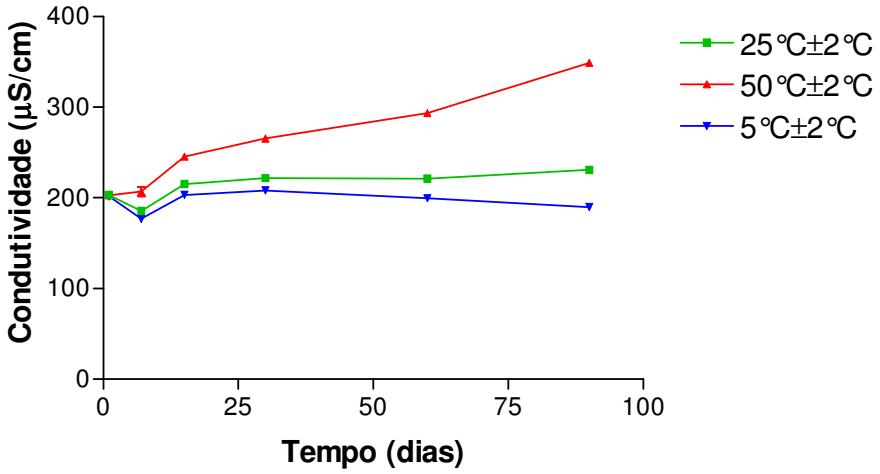



Figura 38: Condutividade elétrica das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo.

O valor de pH dos sistemas também apresentou alterações estatisticamente significativas ($p<0,05$) quando as formulações foram armazenadas a (5±2°C, e 50±2°C), sendo essas alterações mais pronunciadas em altas temperaturas(Figura 39). Como dito anteriormente, a variação no valor de pH pode estar relacionada à oxidação do sistema, com aparecimento de odores desagradáveis, resultantes do processo de oxidação. Assim como nos sistemas aditivados de lanolina etoxilada, as nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada apresentaram mudança no odor no 30°C dia do teste de estabilidade, somente quando as formulações foram armazenadas a 50±2°C. A variação do valor de pH foi mais acentuada em temperaturas elevadas (50± 2°C), o que era esperado pois, sabe-se que a temperatura aumenta a velocidade das reações, causando maior degradação dos ácidos graxos presentes no sistema. Neste caso, a adição de agente antioxidante sintético poderia retardar o processo oxidativo.

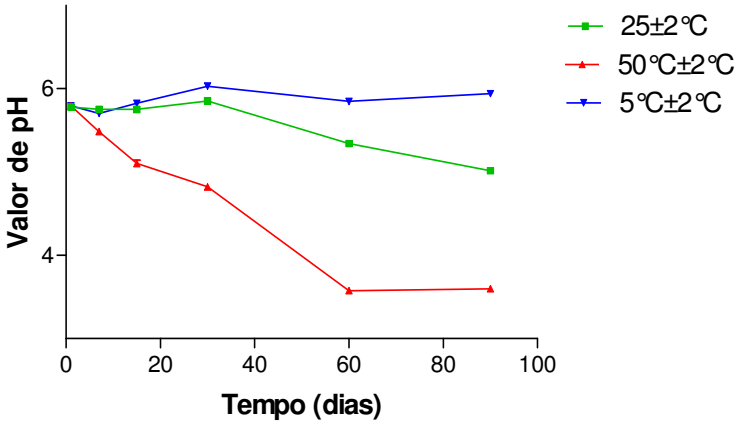



Figura 39: Valor de pH das nanoemulsões aditivadas de lanolina acetilada em função do tempo.

Segundo EE *et al.* (2008) existe uma relação entre a temperatura de armazenamento e a estabilidade de emulsões: valor ótimo de temperatura onde os glóbulos apresentam tamanho mínimo e, o armazenamento das nanoemulsões nessa temperatura assegura a estabilidade das formulações por um período maior de tempo quando comparado ao armazenamento em outras temperaturas. Como demonstrado em nossos resultados, a temperatura de armazenamento 5±2°C, poderia ser considerada essa temperatura ótima. Porém, quando as nanoemulsões foram armazenadas na temperatura de 25C±2°C, apesar de apresentarem alterações, como o tamanho de glóbulos e a condutividade, as mesmas não comprometem a estabilidade do produto permanecendo dentro dos parâmetros aceitáveis. Com relação às alterações no valor de pH, sugere- se a adição de agente antioxidante sintético às nanoemulsões para prevenir/ retardar o processo oxidativo, permitindo que as nanoemulsões mantenham a propriedade antioxidante por maior período de tempo.

5.11 Avaliação *in vivo* da influência das nanoemulsões na hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneos:

5.11.1 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na hidratação cutânea:

Um critério importante no desenvolvimento de produtos cosméticos é a ação positiva na hidratação da pele e a mesma pode ser influenciada pelo veículo ou por ingredientes ativos que são incorporados à formulação (WISSING; MULLER, 2003). A medida da hidratação da pele fornece informações importantes sobre as propriedades biofísicas e a função de barreira, sendo que com uma quantidade adequada de água no estrato córneo, a pele mantém sua função barreira, além de se manter lisa e flexível e com aspecto

saudável (BAZIN; FANCHON, 2006). O grau de hidratação do estrato córneo pode ser avaliado através de técnicas simples, rápidas e não invasivas mensurando as propriedades elétricas e dielétricas da pele. Um método *in vivo* comercialmente disponível avalia a capacitância da pele, envolvendo a aplicação de uma corrente de baixas, frequência e intensidade, de modo que atinja o estrato córneo, sendo realizadas várias medidas a fim de comparar uma região onde o produto foi aplicado e outra sem aplicação, para avaliar o efeito hidratante de um produto cosmético sobre o estrato córneo (HARRIS, 2003). Estudos de hidratação da pele são realizados principalmente em curto prazo, podendo as medidas serem realizadas entre 1 e 8 horas, possibilitando-se verificar a hidratação cutânea mesmo após uma única aplicação do produto (DAL'BELO; GASPAR; CAMPOS, 2006).

Analisando o gráfico da Figura 40, é possível observar que todas as formulações proporcionam hidratação ao estrato córneo, sendo essa hidratação estatisticamente significativa nos tempos 30, 60 e 90 minutos ($p<0,05$) para a nanoemulsão aditivada de lanolina acetilada. Já para a nanoemulsão aditivada de lanolina etoxilada, a hidratação foi significativa apenas nos tempos 30 e 60 minutos. A nanoemulsão não aditivada, foi capaz de manter o estrato córneo hidratado por mais tempo, sendo a hidratação estatisticamente significativa nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. As formulações aditivadas de lanolina acetilada e etoxilada não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p>0,05$), embora, pode- se observar na figura 40 que a formulação aditivada de lanolina acetilada promove maior hidratação da pele quando comparada com a formulação aditivada de lanolina etoxilada. A nanoemulsão não aditivada foi a que resultou em menor hidratação relativa do estrato córneo, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação às nanoemulsões aditivadas.

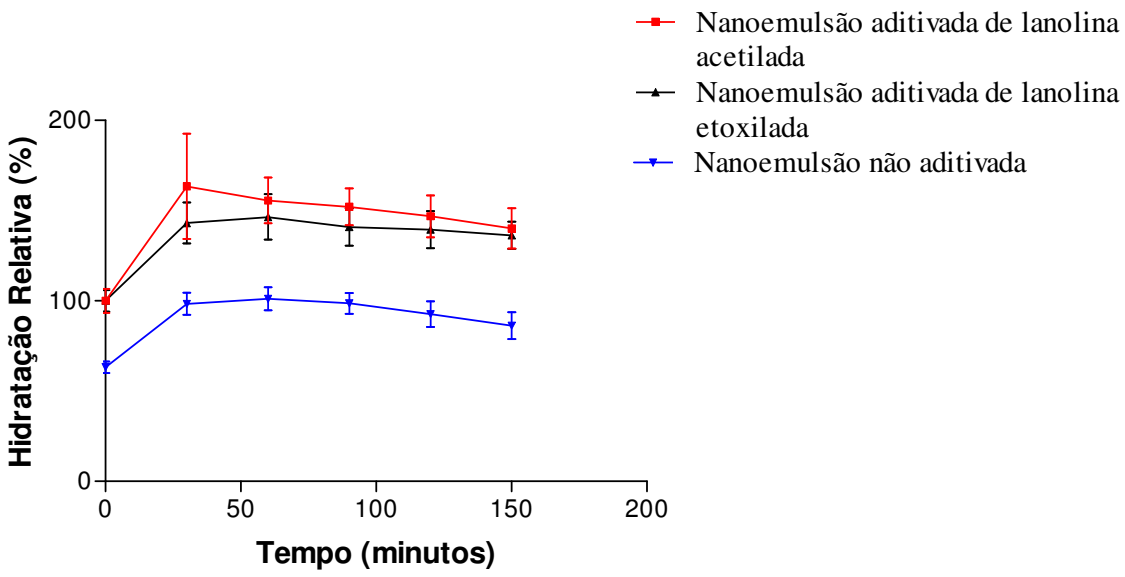



Figura 40: Hidratação relativa do estrato córneo em função do tempo.

Considerando que a lanolina é uma substância emoliente com alta capacidade de absorver água, era esperado que as formulações aditivadas de lanolina tanto acetilada quanto etoxilada resultassem em maior hidratação relativa do estrato córneo que as nanoemulsões não aditivadas.

5.11.2 Avaliação da influência dos derivados de lanolina no valor de pH cutâneo:

O valor de pH ácido da superfície da pele é um importante indicador da sua funcionalidade, devendo-se à produção de ácido lático, conferindo à superfície cutânea o que se chama de "manto ácido cutâneo" (DARLENSKI; FISCHER; BASKETTER, 2008). A pele apresenta pH levemente ácido (4,6-5,8), contribuindo para que ocorra proteção fungicida e bactericida, evitando infecções. Além disso, as secreções cutâneas apresentam propriedades tamponantes, que auxiliam na inalteração do valor de pH da pele.

Desta forma, a determinação e o controle do pH cutâneo são de extrema necessidade para evitar o uso de produtos inadequados, que possam comprometer as funções da pele. Neste contexto, a potenciometria direta tem sido o método mais empregado para avaliar o efeito de formulações cosméticas sobre o pH cutâneo (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

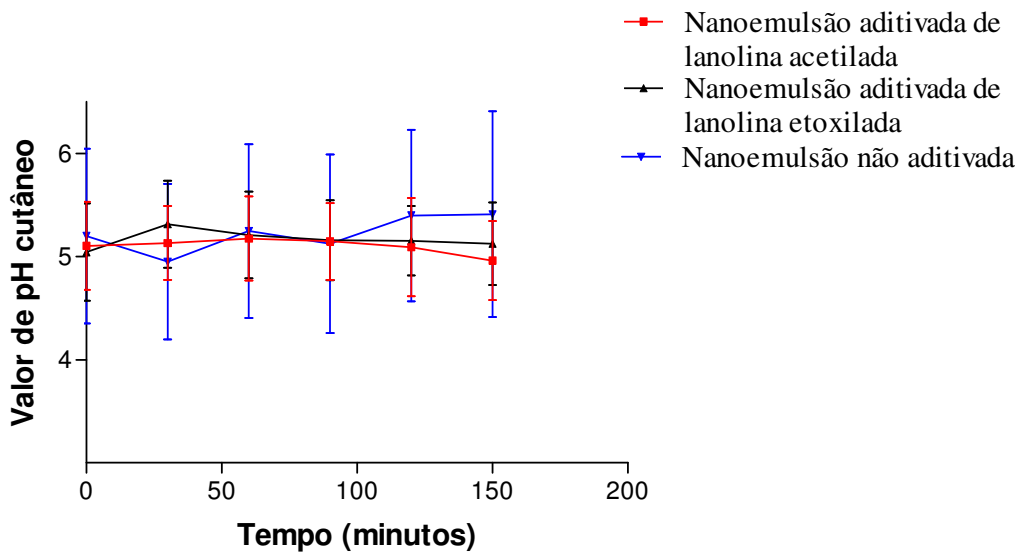



Figura 41: Valor de pH cutâneo em função do tempo.

As nanoemulsões, tanto aditivada de derivados de lanolina quanto não aditivada, não provocaram alterações estatisticamente significativas no valor de pH cutâneo ($p>0,05$), mantendo- o em torno de 5,0 (Figura 41), o que mostra que as formulações estudadas são adequadas para o uso cosmético.

5.11.3 Avaliação da influência dos derivados de lanolina na oleosidade cutânea:

A Figura 42 nos permite observar que as nanoemulsões, tanto aditivada quanto não aditivada de derivados de lanolina promovem aumento no valor de oleosidade cutânea, sendo esse aumento estatisticamente significativo nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos ($p<0,05$) para as nanoemulsões aditivadas tanto de lanolina acetilada quanto de lanolina etoxilada. A formulação não aditivada apresentou aumento estatisticamente significativo da oleosidade em função do tempo, apenas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos ($p<0,05$). Após 120 minutos, observa-se uma queda no valor de oleosidade, provavelmente devido à absorção do produto pela pele. Desta forma, pode-se dizer que as formulações aditivadas de derivados de lanolina mantêm-se por mais tempo sobre a pele que a nanoemulsão não aditivada, tendo essa uma absorção mais rápida. Este fato pode estar relacionado à maior quantidade de material graxo presente nas nanoemulsões aditivadas, uma vez que a alta quantidade de material oleoso pode justificar o aumento na oleosidade cutânea. Não houve diferenças estatisticamente significativas no aumento da oleosidade cutânea em função do tempo entre as formulações ($p>0,05$).

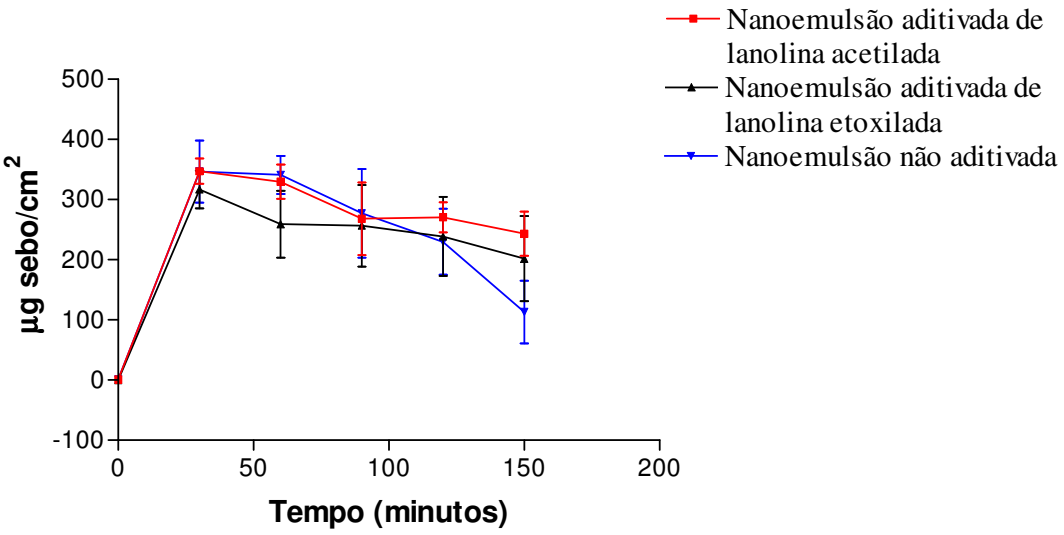



Figura 42: Oleosidade cutânea em função do tempo.

A alta oleosidade da pele proporcionada pelas nanoemulsões tem um efeito bastante positivo no tratamento de peles secas. Desta forma, a nanoemulsão atende ao objetivo pretendido, que é proporcionar a hidratação da pele.

5.11.4 Avaliação *in vivo* do potencial irritante das nanoemulsões:

Eritema ou pele avermelhada representam os maiores sinais de reações inflamatórias causadas pelo contato da pele com substâncias irritantes. A percepção da mudança de coloração da pele devido à inflamação é muito subjetiva, podendo ser influenciada por processos de descamação, pigmentação ou pelos biocromóforos. Desta forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de dispositivos que fornecessem uma avaliação objetiva da alteração da coloração da pele. Um instrumento bastante utilizado para avaliar a cor superficial cutânea é o Chromameter CR 200 (Minolta), o qual ilumina a pele com uma lâmpada de arco de xenônio. A luz refletida perpendicular à superfície é coletada e analisada nos comprimentos de onda de 450, 560 e 600 nm utilizando o sistema de cor L*a*b* (ALEWAETERS; LAMBRECHT;BAREL, 2000, DARLENSKI; FISCHER; BASKETTER, 2008).

Os resultados de variação da cor (parâmetro a*) não revelaram alterações estatisticamente significativas ($p<0,05$) em função do tempo, tanto para as nanoemulsões aditivadas de derivados de lanolina (acetilada e etoxilada), quanto para a nanoemulsão não

aditivada, ou seja, as formulações testadas não promoveram a formação de eritema durante o período do teste (Figura 43).

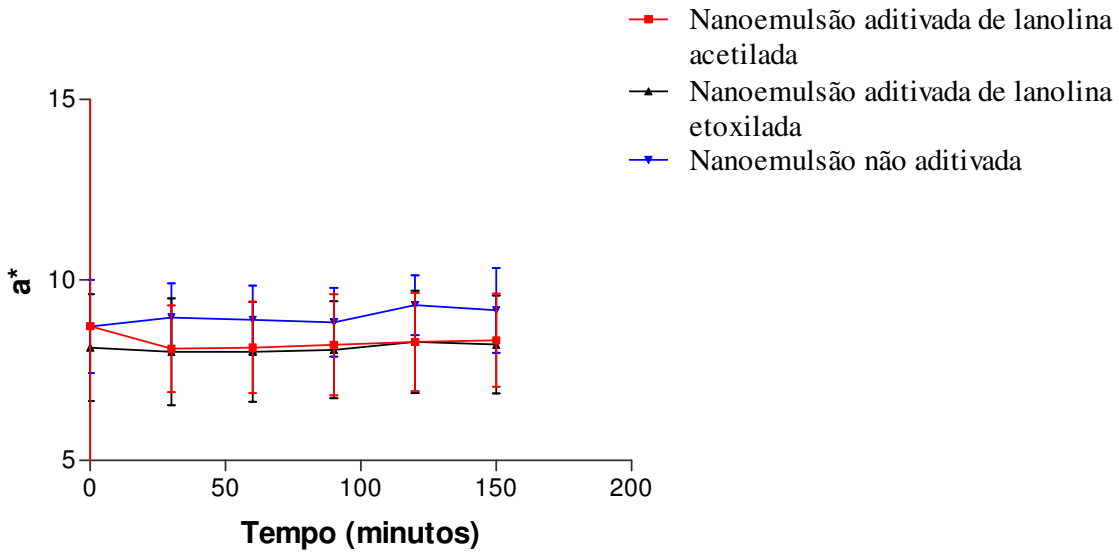



Figura 43: Avaliação da formação de eritema cutâneo (parâmetro a* em função do tempo).

Os dados encontrados no estudo *in vivo* indicam que o produto é não irritante de acordo com as condições analisadas.

# *CONCLUSÃO*

## 6 CONCLUSÃO:

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a mistura oleosa composta pelos óleos de framboesa, maracujá e pêssego (1:1:1) foi a fase oleosa mais adequada para a nanoemulsão, uma vez que a junção dos óleos, logo, das substâncias antioxidantes presentes nesses óleos resultaram em um efeito sinérgico da atividade antioxidante. Nanoemulsões estáveis, transparentes e translúcidas e com pequeno tamanho de glóbulos podem ser facilmente obtidas utilizando-se a o método do EHL associado ao EPI (Emulsion Phase Inversion). A adição de substâncias como os derivados de lanolina (etoxilado e acetilado) podem interferir no processo de emulsificação, causando alterações nas propriedades físico-químicas das nanoemulsões como tamanho de glóbulo e condutividade elétrica, porém, essas alterações não implicam em desestabilização do sistema até determinadas concentrações desses aditivos, a partir das quais observa-se fenômenos de instabilidade. A nanoemulsão aditivada de lanolina etoxilada mostrou-se mais estável que a nanoemulsão aditivadada de lanolina acetilada durante os testes de estabilidade acelerada. Ambas as nanoemulsões (aditivada de lanolina etoxilada e acetilada) promoveram maior hidratação e oleosidade cutânea quando comparadas a nanoemulsão não aditivada, não alterando o valor de pH cutâneo nem provocando o aparecimento de reações alérgicas na forma de eritema. Desta forma, a nanoemulsão aditivada de lanolina etoxilada parece ser a mais indicada para a utilização como veículo em produtos cosméticos e farmacêuticos em razão da sua maior estabilidade.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos /** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52p.

ALEWAETERS, P.C.K.; LAMBRECHT, R., BAREL, A.O. Skin color measurements: comprison between three instruments: the Chromameter, the Dermaspectrometer and the Mexameter. **Skin Research and Technology**, v. 6, p. 230-238, 2000.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 677p.

BADOLATO, G.G; AGUILAR, F; SCHUCHMAM,H.P; SOBISCH, T; LERCHE, D. Evaluation of Long Term Stability of Model Emulsions by Multisample Analytical Centrifugation. **Colloid Polymer Science** v. 134, p. 66–73,2008.

BAREL, A.O. CLARYS, P. GABARD, B. In vivo evaluation of the hydration state of the skin: measurements and methods for claim support. In: ELSNER, P. MERCK, H.F. MAIBACH, H.I. Cosmetics: **Controlled efficacy studies and regulation**, cap. 5, p. 57-77, 1999.

BAZIN, R.; FANCHON, C. Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 6, p. 453-460, 2006.

BEARS, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso**, Porto Alegre; 2ª edição; Artmed Editora;2002.

BERACA SABARÁ. Disponível em: http://beraca.com. Acesso em: 9 Dez. 2010.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199-1200, 1958.

BOUCHEMAL, K; BRIAÇON, S; PERRIER, E; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRASIL ESCOLA. Disponível em: www.brasilescola.com/quimica/fenois.htm. Acesso em: 15 Jan. 2011.

CALGAROTO, C; PILECCO, J; OLIVEIRA,M.P; FURLAN, L; ZAMBIAZI, R. Extração e caracterização do óleo de amêndoa de pêssego.

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

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable O/W emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2005.

CASAGRANDE, R; BARACAT, M.M; GEORGETTI S. R. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. **Quimica Nova***,* v. 32, n. 7, p. 1939-1942, 2009.

COURAGE + KHAZAKA. Sebumeter SM810; Corneometer CM 820; Skin pHmeter PH 900- Information and Operating Instruction (catálogo).

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Moisturizing Effect of Cosmetic Formulations Containing Aloe vera Extract in Different Concentrations Assessed by Skin Bioengineering Techniques. **Skin Research and Technology**, v. 12, p. 241-6, 2006.

DARLENSKI, R; SASSNING, S; TSANKOV, N; FLUHR, J.W. Non-invasive *in vivo* methods for investigation of the skin barrier physical properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, p. 295-303, 2009.

DARLENSKI, R.; ANGELOVA-FISCHER, L.; TSANKOV, N.; BASKETTER, D. Skin irritation and sensitization: Mechanisms and New Approaches for Risk Assessment. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.21, p. 124-135, 2008.

DENG, J.D; CHENG, W; YANG, E. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1430-1435, 2011.

DRAELOS, Z.D. Therapeutic moisturizers. **Dermatologic Clinics**, v. 18, n. 4, p. 597-607, 2000.

ECLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces A*:* Physicochemical and Engineering Aspects,** 123-124: 169-182, 1997.

EE, S.L; DUAN, X; LIEW, J; NGUYEN, D. Droplet size and stability of nano-emulsion produced by the temperature phase inversion method. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, p. 626-631, 2008.

EUCERIN.Disponível em: www.eucerin.com. Acesso em : 10 Dez. 2010.

FERNANDEZ, P; ANDRÉ, V; RIEGER, J; KUHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A*:* Physicochemical and Engineering Aspects**, vol.251, p. 53-58, 2004.

FERRARI, R.A; COLUSSI, F; AYUB, R.A.Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá- aproveitamento das sementes**.** **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, Abr. 2004.

FLYNN, T. C.; PETROS, J.; CLARK, R. E.; VIEHMAN, G. E. Dry skin and moisturizers. **Clinical Dermatology**., v.19, n.4, p.387-392, 2001.

GEORGETTI, S.R; VICENTINE, F.T.M.C; YOKOYAMA, C.Y; BORIN, M.F; SPADARO, A.C.C; FONSECA, M.J.V. Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity andmobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different b-glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459-466, 2009.

GERBRAS. Disponível em: http://www.gerbras.com.br. Acesso em: 9 Dez. 2010.

Guereiro, C. M.; Pereira, T.A.; Rocha-Filho, P. A .Estudo da atividade antioxidante dos óleos de damasco (*Prunus armeniaca*) pêssego (*Prunus persica*) e da mistura dos óleos. In:, 2010, Ribeirão preto. **Anais do 18° Simpósio Internacioanl de Iniciação científica**.

GONÇALVES, G. M. S.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Use of Cutaneous Bioengineering Techniques to Assess the Effects of Anti-Ageing Cosmetic Products. In: IFSCC CONGRESS, 25 th., 2004, Orlando. **Anais.** Orlando: 2004. 1 CD-ROM.

GULLAPALLI, R.P; SHETH, B. B. Influence of an optimized non ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, p. 233-238, 1999.

GUTIÉRREZ, J.M; GONZÁLEZ, C; MAESTRO, A; SOLÉ, I; PEY, C.M; NOLLA,J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science,** vol. 13, p. 245-251, 2008.

GUZMAN, R.D.; TANG, H.; SALLEY, S. Synergistic effects on antioxidants on the oxidative stability of Soybean Oil- and Poultry fat- based biodiesel. **Journal of the American Oil chemists'Society,** v. 86, p. 459-467, 2009.

HADGRAFT, J. Modulation of the barrier fonction of the skin. **Skin Pharmacology Applied Skin Physiology,** v.14, supl.1, n.1, p.72-81, 2001.

HAMADAN, M.F; MOERSEL, F.T. Screening of the antiradical action of vegetables oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 8, p.838-842, 2006.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele : estrutura, propriedades e envelhecimento**. São Paulo : Senac, 2003, 165p.

HASSIMOTTO, N.M.A; MOTA, R.V; CORDENUNSI, B.R; LAJOLO, F.M. Physico-chemical characterizatin and bioactive compounds of blackberry ( *Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28. n. 3, p. 702-708, 2008.

HIGUCHI, W.I., MISRA, J. Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof. **Journal of Pharmaceutical Science**,v. 51, p.459–466, 1962.

HIRATA, L.L; SATO, M.E.O; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.

JAFARI S.M.; HE ,Y.; BHANDARI, B. Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying techniques. **Drying Technology**, v.25, n.6, p.1079 – 1089, 2007.

JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amice oxide compounds on the zeta potencial of emulsion droplets stabilized by phosphatidycholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 181, p. 247-256, 2001.

JOHSEN, G.K. MARTINSEN, O.G. GRIMNES.S. Estimation of in vivo water content of stratum corneum from electrical measurements. **Biomedical Engeneering Journal**, v. 8, p. 8-12, 2009.

KLESK, K.; QUIAN, M.; MARTIN, R.R. Aroma extract dilution analysis of C.V. Meeker ( *Rubus idaeus* L.) red raspberries from Oregon and Washington. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, n. 16, 2004.

KOBORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Revista de Ciências e Agrotecnologia**, v.29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.

KOURNIATIS, L.R. SPINELLI, L.S. MANSUR, C.R.E. GONZÁLES, G. Nanoemulsões óleo de laranja /água preparadas em homogeneizadores de alta pressão. Química nova, v.33, n. 2, p. 295-300, 2010.

KULMYRZAEV, A. A.; SCHUBERT, H. Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids,** v.18, p. 13-21, 2003.

LEONARDI, G.R.**Cosmetologia aplicada**. São Paulo : Medfarma, 2004.234p.

LEONARDI, G.R; GASPAR, L.R; CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n.5, p.563-569, Set./Out. 2002.

LEOW, Y.; MAIBACH, H.I. Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen. **Clinics in Dermatology**, v.16, n.5, p.579-584, 1998.

LI, Z.; MING, T.; WANG, J.; NGAI, T. High inernal phase emulsions stabilized solely by microgel particles. **Angewandte Chemie**, v. 121, n. 45, p. 8642-8645, 2009.

LIPO DO BRASIL. Disponível em:<http://www.lipodobrasil.com.br/paginas_dinamicas/det.asp?iType=84&iPic=704>. Acesso em: 18/02/2009.

LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of parafin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, p. 557-563, 2006.

LÓPEZ, A; RICO, M; RIVERO, A; TANGEL, M.S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stapocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chemistry**, v. 125, p.1104-1109, 2011.

MAESTRO, A; SOLÉ, I; GONZÁLEZ C; SOLANS, C; GUTIÉRREZ J.M. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 327, p. 433-439, 2008.

MAGDASSI, S. Delivery systems in Cosmetics. **Colloids and Surfaces A*: Physicochemical and Engineering Aspects,*** 123–124: 671–679, 1997.

MAINARDES, R .M., EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal Pharmaceutical** v. 290, p**.** 137–44, 2005.

MAKSIMOVIC, Z. In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrósia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p.356-360, 2008.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W Nanoemulsion After 15 Years of Preparation: A Suitable Vehicle for Pharmaceutical and Cosmetic Applications **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, p. 17-22, 2010.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.;KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceuticalemulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal Pharmaceutical,** v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A.; CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v.43, n.4, p.649-657, 2007.

MIRANOVA, E.; TONEVA, A.; YANISHLIEV,A. N. Synergistic antioxidant effect of a-tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 106, p.628–633, 2008.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity . **Journal of Science Technology,** v. 26 ,n.2, p. 211-219, 2004.

MORAIS, G.C; SANTOS, O. D. H; OLIVEIRA, W.P; ROCHA-FILHO, P.A.Attainment of O/W Emulsions Containing Liquid Crystal fromAnnatto 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, p. 297-306, 2008.

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

MORRISON, I.D; ROSS, S. Emulsions. **Colloidal dispersions-suspensions-emulsions and foams**, p. 420-455, 2002.

NATURA. Disponível em: www.natura.net. Acesso em: 6 Ago. 2008.

NATURA. Disponível em: naturaconsultorasandra.wordpress.com/. Acesso em: 5 nov. 2009.

NATURA EKOS. Disponível em : www.naturaekos.com.br. Acesso em: 10 dez. 2010.

OLIVEIRA, E.C.V.**Desenvolvimento e caracterização de creme para as mãos contendo cristais líquidos para o auxilio no tratamento de doenças ocupacionais**. 2010. 132f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

OLIVEIRA, M. A. O.; CEREDA, M. P. Pós-colheita de pêssegos (*Prinus persica* L. Bastsch) revestidos com filmes a base de amido como alternativa à cera comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 28-33, 2003.

OOMAH, B. D.; LADET, S.; GODFREY, D.V; LIANG, J.; GIRARD, B. Characteristics of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. **Food chemistry**, v. 69, p. 187-193, 2000.

PAILLER-MATTEI, C.; PAVAN, S.; VARGIOLU, R.; PIROT, F.; FALSON, F.; ZAHOUANI, H. Contribution of stratum corneum in determining bio-tribological properties of the human skin. **Wear**, v. 263, p. 1038-1043, 2007.

PENG, L. C.; LIU, C.H.; KWAN, C.C.; HUANG, K. F. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 370, p. 136-142, 2010.

PETERSEN, R. D. Ceramides: key components for skin protection. **Cosmetic & Toiletries**, v.107, n.2, p.45-49, 1992.

PHARMADERM. Disponivel em: www.pharmaderm.far.br/.../acai_framboesa.php. Acesso em: 5 nov. 2009.

PHARMASPECIAL. Disponível em: www.pharmaspecial.com.br . Acesso em: 9 Dez. 2010.

PONS-GUIRAUD. Dry skin in dermatology:a complex physiopatology. **European Academy of Dermatology and Venerology**, v. 2, p. 1-4, 2007.

PRISTA, L. N.; ALVES, A.C;MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1995.1v.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAWLINGS, A.V. HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatology Therapy**, v.17, p. 43-48,2004.

RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermoestética. 2. Ed. 2010.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, **International Journal of Pharmaceutics**, v.263, p.85-94, 2003.

ROSSI, A. B. R.; VERGNANINI, A. L. Mecanismos de hidratação da pele. **Cosmetic & Toiletries,** São Paulo, v.9, n.6, p.33-39, 1997.

SAJJADI, S. Formation of fine emulsions by emulsification at high viscosity or low interfacial tension: A comparative study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 299, p. 73-78, 2007.

SCHULLER, R.; ROMANOWSKY, P. Understanding emulsions. **Cosmetic & toiletries**, v. 113, n. 09, p.39-44, 1998.

SHARMA, B.; PEREZ, J.; ERHAN, S. Soybean oil-based lubricants: a search for synergistic antioxidants. **Energy Fuels**, v. 21, p. 2408–2414, 2007.

SOLANS, C; IZQUIERDO, P; NOLLA, J; AZEMAR, N; CELMA, M.J.G. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, vol. 10, p. 102-110, 2005.

SOLÉ, I; MAESTRO, A; GONZÁLEZ, C; SOLANS, C; GUTIÉRREZ, J.M. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A*: Physicochemical and Engineering Aspects***, vol.288, p. 138-143, 2003.

SOUZA, C. R .F.; GEORGETTI, R.; SALVADOR, M. J.; FONSECA, M.J.V.; OLIVEIRA, W.P. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray an spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 45, n.2, 2009.

SPINELLI, L.S.; MANSUR, C.R.E.; GONZÁLEZ, G.; LUCAS, E.F. Evaluation of process conditions and characterization of particle size stability of oil-in-water nanoemulsions.**Colloid Journal**, v.72, n. 1, p. 56-65, 2010.

STAMKULOV, N.S.; MUSSABEKOV, K.B.; AIDAROVA, S.B.; LUCKHAM, P.F. Stabilization of emulsions by using a combination of an oil soluble ionic surfactant and water soluble polyeletrolytes I: Emulsion stabilization and interfacial tension measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 335, n. 1-3, p. 103-106, 2009.

STONE, L. Medilan: a hypoallergenic lanolin for emollient therapy**. British Journal of Nursing,** v. 9, n. 13, p. 54 – 57, 2000.

SUMMERS, R. S.; SUMMERS, B.; CHANDAR, P. ; FEINBERG, C. ; GURSKY, R. ; RAWLINGS, A. V. The effect of lipids, with and without humectant, on skin xerosis. **Journal of Cosmetic chemistry***,* v.47, n.1, p.27-39, 1996.

THADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloids and Interface Science**, v.108 –109, p. 303-318, 2004.

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

VIAFARMA. Disponivel em: http://www.viafarmanet.com.br. Acesso em: 12 Mai. 2008.

ZANIN, S.M.W; CHIMELLI, M.C; OLIVEIRA, A. B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de óleos de origem vegetal.**Visão Acadêmica**, v. 3, n.1, p. 13-18, 2002.

ZHANG, L.; QHE, G. Influence of the HLB parameter of surfactants on the dispersion properties of brine in residue. **Colloids and Surfaces A*: Physicochemical and Engineering Aspects***, v. 320, p. 111-114, 2008.

YANG, H.J.; CHO, W.G.; PARK, S.N. Stability of oil-in-water nano-emulsions prepared using the phase inversion composition method. **Journal of Industrial an Engineering Chemistry**, vol.15, p.331-335, 2009.

WADA, L; OU, B. Antioxidant activity and phenolic contento of oregon caneberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, n. 12, 2002.

WISSING, S.A.; MULLER, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 67-72, 2003.

WOOSTER, T.J; GOLDING, M; SANGUARNSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsions formation and Ostwald Ripening stability. **American Chemical Society**, v. 24, p. 12758-12765, 2008.

# *APÊNDICES*

# 8 APÊNDICES:

## Apêndice A: Tabelas

Tabela 1: Análise granulométrica, condutividade e valor de pH das formulações aditivadas de lanolina etoxilada.

| Concentração (%) de lanolina etoxilada | Tamanho do glóbulo (±DP) (nm) | I.P.(*) (±DP) | Condutividade (±DP) (µS/cm) | Valor de pH (±DP) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 85,06 ± (1,584) | 0,173 ± (0,008) | 128,9±(1,447) | 5,98± (0,035) |
| 2 | 90,06 ± (5,171) | 0,190 ± (0,012) | 155,1±(2,750) | 5,97± (0,011) |
| 4 | 98,40 ± (3,846) | 0,165 ± (0,014) | 181,9±(0,586) | 5,97± (0,023) |
| 6 | 95,33± (4,043) | 0,166 ± (0,017) | 204,1±(1,595) | 5,95± (0,006) |
| 8 | 93,13 ± (1,597) | 0,157 ± (0,007) | 222,1±(1,943) | 5,95± (0,021) |
| 10 | 102,33±(1,154) | 0,173 ± (0,050) | 235,2±(1,656) | 5,95± (0,026) |

(*) índice de polidispersividade. Os valores representam as médias e os desvios padrão da média (n=3).

Tabela 2: Análise granulométrica, valor de condutividade e de pH das formulações aditivadas de lanolina acetilada.

| Concentração (%) de lanolina acetilada | Tamanho do glóbulo (±DP) (nm) | I.P.(*) (±DP) | Condutividade (±DP) (µmS/cm) | Valor de pH (±DP) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 85,06 ± (1,582) | 0,173 ± (0,008) | 128,9 (1,447) | 5,98 (0,035) |
| 1 | 92,20 ± (1,670) | 0,202 ± (0,002) | 113,1 (1,582) | 5,69 (0,026) |
| 2 | 106,00 ± (1,730) | 0,207 ± (0,015) | 112,6(1,823) | 5,81 (0,032) |
| 3 | 113,00 ± (1,414) | 0,225 ± (0,046) | 110,0 (0,964) | 5,91 (0,113) |
| 4 | 127,00 ± (6,082) | 0,204 ± (0,021) | 106,0 (4,821) | 5,92 (0,015) |

(*) índice de polidispersividade. Os valores representam as médias e os desvios padrão da média (n=3).

Tabela 3: Tensão interfacial das nanoemulsões, não aditivada e aditivada de derivados de lanolina.

| Concentração (%) de lanolina etoxilada | Tensão interfacial ($mN.m^{-1}$) | Concentração (%) de lanolina acetilada | Tensão interfacial ($mN.m^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0,0 | $3,52 \times 10^5 \pm 9,61 \times 10^7$ | 0,0 | $3,52 \times 10^5 \pm 9,61 \times 10^7$ |
| 2,0 | $3,56 \times 10^5 \pm 5,51 \times 10^7$ | 1,0 | $3,70 \times 10^5 \pm 3,00 \times 10^7$ |
| 4,0 | $3,56 \times 10^5 \pm 3,78 \times 10^7$ | 2,0 | $3,61 \times 10^5 \pm 3,60 \times 10^7$ |
| 6,0 | $3,72 \times 10^5 \pm 2,52 \times 10^7$ | 3,0 | $3,60 \times 10^5 \pm 5,51 \times 10^7$ |
| 8,0 | $3,70 \times 10^5 \pm 1,73 \times 10^7$ | 4,0 | $3,52 \times 10^5 \pm 1,73 \times 10^7$ |
| 10,0 | $3,73 \times 10^5 \pm 3,05 \times 10^7$ | _ | _ |

Tabela 4: Teste de estabilidade acelerada da nanoemulsão aditivada de lanolina etoxilada.

| Temperatura de armazenamento (**±2**°C) | Tempo (dias) | Tamanho do glóbulo (±DP) (nm) | Condutividade (±DP) (µS/cm) | Valor de pH (±DP) |
|---|---|---|---|---|
| **25** | 1 | 81,00±(0,000) | 203,0±(0,850) | 5,78±(0,005) |
| | 7 | 79,76±(0,568) | 185,5±(0,854) | 5,75±(0,020) |
| | 15 | 80,26±(0,945) | 215,0±(1,050) | 5,75±(0,000) |
| | 30 | 79,93±(1,357) | 221,6±(1,527) | 5,85±(0,015) |
| | 60 | 77,06±(0,404) | 221,0±(1,350) | 5,34±(0,000) |
| | 90 | 77,96±(1,761) | 230,7±(2,154) | 5,01±(0,020) |
| **50** | 1 | 82,90±(0,000) | 202,8±(0,450) | 5,79±(0,005) |
| | 7 | 80,93±(0,404) | 206,7±(8,793) | 5,48±(0,047) |
| | 15 | 83,26±(1,973) | 245,6±(3,536) | 5,10±(0,066) |
| | 30 | 80,10±(0,871) | 265,6±(2,272) | 4,82±(0,051) |
| | 60 | 77,93±(2,136) | 293,6±(2,285) | 3,57±(0,055) |
| | 90 | 77,10±(0,519) | 348,8±(4,616) | 3,60±(0,020) |
| **5** | 1 | 86,00±(0,000) | 201,4±(0,057) | 5,79±(0,005) |
| | 7 | 85,53±(1,258) | 176,8±(3,102) | 5,70±(0,040) |
| | 15 | 86,93±(2,510) | 203,1±(0,945) | 5,82±(0,005) |
| | 30 | 86,03±(0,461) | 208,1±(1,026) | 6,03±(0,010) |
| | 60 | 84,73±(0,873) | 199,5±(2,010) | 5,84±(0,005) |
| | 90 | 84,60±(0,529) | 189,7±(1,517) | 5,94±(0,017) |

Tabela 5: Teste de estabilidade acelerada da nanoemulsão aditivada de lanolina acetilada.

| Temperatura de armazenamento (**±2**°C) | Tempo (dias) | Tamanho do glóbulo (±DP) (nm) | Condutividade (±DP) (µS/cm) | Valor de pH (±DP) |
|---|---|---|---|---|
| **25** | 1 | 84,50±(0,000) | 119,6±(0,000) | 6,47±(0,000) |
| | 7 | 83,26±(1,537) | 116,0±(0,000) | 6,50±(0,0000 |
| | 15 | 87,26±(7,138) | 107,7±(0,351) | 6,29±(0,010) |
| | 30 | 90,63±(9,290) | 137,5±(1,021) | 6,14±(0,005) |
| | 60 | 78,90±(0,700) | 155,1±(0,960) | 5,44±(0,020) |
| | 90 | 76,93±(0,350) | 168,9±(1,955) | 4,49±(0,061) |
| **50** | 1 | 83,20±(0,000) | 121,2±(0,000) | 6,42±(0,000) |
| | 7 | 80,43±(0,568) | 118,0±(0,000) | 6,40±(0,000) |
| | 15 | 82,83±(1,563) | 131,5±(1,301) | 5,77±(0,032) |
| | 30 | 80,93±(3,397) | 176,0±(2,424) | 4,73±(0,060) |
| | 60 | 93,46±(8,342) | 237,4±(25,270) | 3,67±(0,135) |
| | 90 | 103,73±(8,967) | 317,0±(47,584) | 3,37±(0,147) |
| **5** | 1 | 83,90±(0,000) | 119,9±(0,000) | 6,40±(0,000) |
| | 7 | 83,86±(0,763) | 116,3±(0,000) | 6,45±(0,000) |
| | 15 | 90,43±(6,140) | 106,7±(1,216) | 6,37±(0,005) |
| | 30 | 82,93±(0,230) | 126,2±(1,137) | 6,37±(0,005) |
| | 60 | 86,06±(1,365) | 125,9±(1,006) | 6,38±(0,005) |
| | 90 | 82,26±(0,378) | 124,9±(1,386) | 6,40±(0,017) |