Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

*Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões
O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para
tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).*

Gilsane Garcia Moraes

*Ribeirão Preto
2006*

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

*Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos
acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).*

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Área de concentração:
Medicamentos e Cosméticos.*

Orientada: Gilsane Garcia Morais

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Ribeirão Preto

2006

Folha de assinaturas da comissão julgadora da Dissertação de Mestrado

Autora: Gilsane Garcia Moraes

Título: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos
acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho
Orientador

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/2006

Dedicatória

*Aos meus pais, **Gilton e Arminda**, meu espelho e razão de vida!!! Por tudo que representam para mim: amor incondicional, apoio e incentivo, sábia orientação, permanente presença, força para superação de obstáculos, caráter inquestionável, ensinamentos valiosos que muito auxiliaram dando-me base necessária para vencer esta e todas as etapas que estão por vir. E, acima de tudo, por sempre depositarem toda confiança em mim. A vocês meu eterno agradecimento e AMOR!!!*

*Aos meus irmãos, **Giuliano, Ariane e Ariadne**, pela eterna amizade, companheirismo, amor, apoio, conselhos, torcida... E, finalmente, por me proporcionarem viver sentimentos como extremo ORGULHO!!!*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos que participaram da minha jornada e que de muitas formas contribuíram para a realização desta dissertação. Em especial:

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho**, por me orientar de forma profícua, sempre com respeito, dedicação, carinho, paciência, incentivo, contribuição na ampliação dos meus conhecimentos, tanto no profissional, como no pessoal. Por sua amizade e valiosas lições que ultrapassaram as barreiras do laboratório e certamente me acompanharão para toda a vida.

A todos os amigos de laboratório – **família KOSMOS** – por terem me recebido e de alguma forma me dado a oportunidade de fazer parte de suas vidas, por todo auxílio prestado e pelas horas divertidas vividas nessa família. Obrigada sempre....

Aos membros da Banca Examinadora da Qualificação e Defesa e ao assessor, **Prof^a. Dr^a. Juliana M. Marcheti, Prof^a. Dr^a. Marilisa Guimarães Lara e Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Borges Isaac**, pela cooperação com sugestões valiosas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores **Dr^a. Eliane Candini Arantes Braga, Dr^a. Maria José Viera Fonseca, Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopes, Dr. Wanderley Pereira de Oliveira**, que gentilmente cederam seus laboratórios para a realização de experimentos.

A **todos os funcionários da FCFRP**, em destaque aos da Pós – Graduação e Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto, pelo atendimento e dedicação.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de crescimento científico e pessoal.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

À **Concepcion Chacon Tonin** por ter sido sempre acolhedora, receptiva e, principalmente, despertado em mim o interesse pela pesquisa.

Às **Empresas** que gentilmente cederam matérias-primas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **DAAD, Universidade Martin-Luther, Prof. Dr. R.H.H. Neubert e Dr. rer. nat. Yahya Mrestani** por terem me proporcionado aprimoramento dos meus conhecimentos e enriquecimento deste trabalho.

Às amigas **Dayse e Frau Heide** pela paciência, carinho, respeito, apoio, amizade e bons momentos de trabalho e ambiente harmonioso.

Aos amigos **Augusto, Franciane, Leonardo, Marlus e Valéria** pela importante colaboração e amizade semeada nesta etapa.

Aos amigos – “irmãos”: **Carol, Dany, Fábio, Gislaine (Gi), Marcinha** (comadre), **Paula, Juliane** (Ju), pela paciência, apoio, respeito, carinho, incentivo, compreensão, amizade.... A vocês não tenho mais como expressar minha gratidão e carinho... Desculpe-me por muitas vezes ter me ausentado....

À **toda minha família** pelo eterno incentivo, apoio e coragem para que eu pudesse atingir meu objetivo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, o meu profundo respeito, homenagem e eterna gratidão.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	iv
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1. Pele	6
Epiderme	7
Estrato córneo	8
Derme	9
Hipoderme	10
2.2. Celulite	12
Tratamento	15
Cafeína	17
2.3. Emulsões	19
Sistema EHL	20
Estabilidade das emulsões	22
2.4. Cristais líquidos	26
Identificação dos cristais líquidos	29
Propriedades dos cristais líquidos	30
2.5. Óleos vegetais	32
Generalidades	32
Óleo de urucum	33
Óleo de café	34

Óleo de melaleuca	35
3. Objetivos	36
4. Material e Métodos	38
4.1. Material	39
4.1.1. Fase oleosa	39
4.1.2. Fase aquosa	40
4.1.3. Solução Tampão	40
4.1.4. Equipamentos	41
4.2. Métodos	42
4.2.1. Desenvolvimento das emulsões O/A	42
4.2.1.1. Preparo das emulsões	42
4.2.1.2. Determinação do valor do EHL requerido (Sistema EHL)	42
4.2.1.3. Obtenção de fase líquida cristalina e estudo do perfil reológico	44
4.2.1.4. Diagrama de fase (diagrama ternário– óleo / tensoativo / água)	45
4.2.1.5. Determinação da velocidade de agitação no preparo das emulsões	46
4.2.1.6. Incorporação da cafeína	46
4.2.1.6.1. Seleção da formulação	46
4.2.1.6.2. Seleção do processo de incorporação	47
4.2.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A	48
4.2.2.1. Testes de Estabilidade Preliminares (TEP)	48
4.2.2.1.1. Análise macroscópica	48
4.2.2.1.2. Teste de centrifugação	49
4.2.2.1.3. Análise microscópica	49
4.2.2.1.4. Estresse térmico	49
4.2.2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA)	50
4.2.2.3. Determinação dos valores de pH	51

4.2.2.4. Determinação da condutividade elétrica	51
4.2.2.5. Determinação da densidade	51
4.2.2.6. Comportamento Reológico	52
4.2.3. Avaliação da liberação da cafeína <i>in vitro</i>	53
4.2.3.1. Construção da Curva de Calibração em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 – Espectrofotometria	53
4.2.3.2. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5	53
4.2.3.3. Avaliação da liberação da cafeína – Diálise	54
4.2.3.4. Comparação da metodologia de análise da cafeína – Eletroforese Capilar (CE)	55
4.2.3.4.1. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Espectrofotometria	55
4.2.3.4.2. Solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0	56
4.2.3.4.3. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Eletroforese Capilar (CE)	56
4.2.3.4.4. Avaliação da liberação da cafeína – Sistema de membrana em multicamadas (“ <i>multilayer membrane system</i> ”)	57
5. Resultados	60
5.1. Desenvolvimento das emulsões O/A	61
5.1.1. Determinação do valor do EHL requerido (Sistema EHL)	61
5.1.1.1. Fase oleosa contendo apenas óleo de urucum (valor do EHL requerido do óleo de urucum)	61
5.1.1.2. Fase oleosa contendo óleo de urucum, de café e de melaleuca (valor do EHL requerido do sistema de óleos)	63
5.1.2. Obtenção de fase líquida cristalina e estudo do perfil reológico	66
5.1.3. Diagrama de fase (diagrama ternário – óleo / tensoativo / água)	70
5.1.4. Determinação da velocidade de agitação no preparo das emulsões	75

5.1.5. Incorporação da cafeína	79
5.1.5.1. Seleção da formulação	79
5.1.5.2. Seleção do processo de incorporação	80
5.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A	81
5.2.1. Testes de Estabilidade Preliminares (TEP)	81
5.2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA)	84
5.3. Avaliação da liberação da cafeína <i>in vitro</i>	92
5.3.1. Construção da Curva de Calibração em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 – Espectrofotometria	92
5.3.2. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5	93
5.3.3. Avaliação da liberação da cafeína – Diálise	93
5.3.4. Comparação da metodologia de análise da cafeína – Eletroforese Capilar (CE)	98
5.3.4.1. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Espectrofotometria	98
5.3.4.2. Solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0	99
5.3.4.3. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Eletroforese Capilar (CE)	100
5.3.4.4. Avaliação da liberação da cafeína – Sistema de membrana em multicamadas (“ <i>multilayer membrane system</i> ”)	101
6. Discussão	102
6.1. Desenvolvimento das emulsões O/A	103
6.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A	121
6.3. Avaliação da liberação da cafeína <i>in vitro</i>	127
7. Conclusões	134
8. Referências Bibliográficas	137
9. Apêndices	153

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Composição das formulações com óleo de urucum desenvolvidas em função da determinação do valor do EHL	43
Tabela 2- Composição das formulações com óleo de urucum, café e melaleuca como fase oleosa desenvolvidas em função da determinação do valor do EHL	43
Tabela 3- Composição das formulações desenvolvidas com óleo de urucum e <i>Cetereath 5</i> , em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	44
Tabela 4- Composição das formulações com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Steareth 2</i> , desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	44
Tabela 5- Composição das formulações selecionadas do diagrama de fase	45
Tabela 6- Composição das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção da formulação	47
Tabela 7- Composição da formulação com ativo (cafeína + benzoato de sódio) desenvolvida para avaliação da liberação da cafeína através do sistema de membrana em multicamadas (“ <i>multilayer membrane system</i> ”)	59
Tabela 8- Quantidades de tensoativos de acordo com o valor de EHL	61
Tabela 9- Resultados da análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL requerido	62
Tabela 10- Quantidades de tensoativos de acordo com o valor de EHL	64
Tabela 11- Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com óleo de urucum, café e melaleuca desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL requerido	65
Tabela 12- Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões desenvolvidas com óleo de urucum e <i>Cetereath 5</i> , em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	66
Tabela 13- Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões com óleo de urucum desenvolvidas com <i>Cetereath 5</i> em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	67

Tabela 14- Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Steareth 2</i> , desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	69
Tabela 15- Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Steareth 2</i> , desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos	70
Tabela 16- Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões selecionadas do diagrama de fases	71
Tabela 17- Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Steareth 2</i> (10,0%) com valor de EHL 9,0, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo	75
Tabela 18- Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões constituídas pelo sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e 10,0% da mistura de <i>Cetereath 5</i> + <i>Steareth 2</i> com valor de EHL 9,0, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo	78
Tabela 19- Valores médios da densidade (d) e gravidade específica (SG) das emulsões com valor de EHL 9,0, constituídas pelo sistema de óleos e 10,0% da mistura de <i>Cetereath 5</i> + <i>Steareth 2</i> , desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo	79
Tabela 20- Resultados da análise macroscópica, teste de centrifugação e análise microscópica das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção da formulação	80
Tabela 21- Resultados da análise macroscópica, teste de centrifugação e análise microscópica das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção do processo de incorporação do ativo	81
Tabela 22- Composição das formulações desenvolvidas com 15,0% da mistura de <i>Cetereath 5</i> + <i>Steareth 2</i> , sem ou com ativo (cafeína + benzoato de sódio).....	82
Tabela 23- Resultados dos Testes de Estabilidade Preliminares das emulsões B11 (15,0% de tensoativo) e D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio)	83
Tabela 24- Resultado do estresse térmico das emulsões B11 (15,0% de tensoativo) e D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio)	83
Tabela 25- Resultado da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento	85

Tabela 26- Valores de pH e de condutividade elétrica das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento	86
Tabela 27- Resultado da análise microscópica das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento	89
Tabela 28- Resultado da avaliação da liberação da cafeína por diálise: quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c)	94
Tabela 29- Resultado da avaliação da liberação da cafeína+benzoato por diálise: quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d)	96
Tabela 30- Parâmetros cinéticos de liberação da cafeína por diálise a partir das emulsões contendo cristal líquido (formulação B11c e D6d)	98
Tabela 31- Resultado da quantificação de cafeína e benzoato de sódio liberada a partir de microemulsão (formulação F1) após 1 hora através de Sistema de membrana em multicamadas (“ <i>multilayer membrane system</i> ”) e analisada por eletroforese capilar (CE)	101

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Estrutura geral da pele. Epiderme, derme e hipoderme (PEYREFITTE <i>et al.</i> , 1998)	6
Figura 2- Estrutura da pele normal e com celulite (COMO SE DESENVOLVE A CELULITE, 2005)	13
Figura 3- Organização das células na hipoderme do homem e da mulher (DIFERENÇA ENTRE HOMEM E MULHER, 2005)	15
Figura 4- Fórmula estrutural da cafeína (THE MERCK INDEX, 2001)	18
Figura 5- Estruturas das fases líquidas cristalinas liotrópicas. (a) fase hexagonal, (b) fase lamelar, (c) fase cúbica (LOCHHEAD, 1994; TYLE, 1989)	29
Figura 6- Diagrama ternário óleo-tensoativo-água. Região destacada representa as emulsões selecionadas para o estudo	45
Figura 7- Fotografia do aparato contendo 9 células utilizado no sistema de membrana em multicamadas (“ <i>multilayer membrane system</i> ”)	58
Figura 8- Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões preparadas com óleo de urucum e <i>Ceteareth-5</i> , 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão A5 (10,0% de tensoativo); (b) emulsão A6 (15,0% de tensoativo); (c) emulsão A7 (10,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetoestearílico); (d) emulsão A8 (15,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetoestearílico)	67
Figura 9- Reograma obtido para as emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,2) e obtenção de cristais líquidos, 24 horas após o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento (γ). A5: <i>Ceteareth-5</i> 10,0%; A6: <i>Ceteareth-5</i> 15,0%; A7: <i>Ceteareth-5</i> 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%; A8: <i>Ceteareth-5</i> 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%	68
Figura 10- Representação gráfica dos valores de viscosidade aparente (μ) <i>versus</i> taxa de cisalhamento (γ) obtidos para as emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,2) e obtenção de cristais líquidos. A5: <i>Ceteareth-5</i> 10,0%; A6: <i>Ceteareth-5</i> 15,0%; A7: <i>Ceteareth-5</i> 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%; A8: <i>Ceteareth-5</i> 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%	68
Figura 11- Fotomicrografia das emulsões preparadas com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos <i>Cetereath 5</i> e <i>Steareth 2</i> , 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B10 (10,0% de tensoativo); (b) emulsão B11 (15,0% de tensoativo). I: microscopia com luz polarizada; II: microscopia sem polarização	69

Figura 12- Reograma obtido para as emulsões com sistema de óleos desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,0) e obtenção de cristais líquidos, 24 horas após o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). B10: *Ceteareth 5 + Steareth 2* 10,0%; B11: *Ceteareth 5 + Steareth 2* 15,0% 70

Figura 13- Representação gráfica dos valores de viscosidade aparente (μ) *versus* taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) obtidos para as emulsões com sistema de óleos desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,0) e obtenção de cristais líquidos. B10: *Ceteareth 5 + Steareth 2* 10,0%; B11: *Ceteareth 5 + Steareth 2* 15,0% 70

Figura 14- Fotomicrografia das emulsões B10 e C1, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B10 (10,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C1 (15,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 72

Figura 15- Fotomicrografia das emulsões B11 e C3, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B11 (10,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (b) emulsão C3 (5,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 72

Figura 16- Fotomicrografia das emulsões C4 e C5, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão C4 (5,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C5 (10,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 73

Figura 17- Fotomicrografia das emulsões C6 e C7, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão C6 (15,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (b) emulsão C7 (20,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 73

Figura 18- Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões B10, C1, B11 e C3, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão C3 (5,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (b) emulsão B11 (10,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (c) emulsão C1 (15,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (d) emulsão B10 (10,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos) 74

Figura 19- Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões C4, C5, C6 e C7, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão C7 (20,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C6 (15,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (c) emulsão C5 (10,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (d) emulsão C4 (5,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos) 74

- Figura 20-** Fotomicrografia da emulsão B10a (300 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*) após 24 horas da manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I:** microscopia com luz polarizada; **II:** microscopia sem polarização 76
- Figura 21-** Fotomicrografia da emulsão B10b (600 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 76
- Figura 22-** Fotomicrografia da emulsão B10c (900 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 77
- Figura 23-** Fotomicrografia da emulsão B10d (1200 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 77
- Figura 24-** Reograma obtido para as emulsões constituídas com sistema de óleos e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). B10a- 300 rpm; B10b- 600 rpm; B10c- 900 rpm; B10d- 1200 rpm; B10e- 1500 rpm 78
- Figura 25-** Valores de viscosidade aparente (μ) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) obtidos para as emulsões constituídas com sistema de óleos e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo. B10a- 300 rpm; B10b- 600 rpm; B10c- 900 rpm; B10d- 1200 rpm; B10e- 1500 rpm 78
- Figura 26-** Fotomicrografia da emulsão B11 (15,0% de tensoativo) antes do estresse térmico, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 83
- Figura 27-** Fotomicrografia da emulsão D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio) antes do estresse térmico, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). **I:** microscopia sem polarização; **II:** microscopia com luz polarizada 84
- Figura 28-** Variação de pH das formulações B11 e D6d quando armazenadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. pH/pH_0 = razão do valor de pH num determinado tempo pelo valor de pH inicial (24 horas após o preparo) 87
- Figura 29-** Variação de condutividade elétrica das formulações B11 e D6d quando armazenadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. μ/μ_0 = razão do valor de condutividade num determinado tempo pelo valor de condutividade inicial (24 horas após o preparo) 88

Figura 30- Fotomicrografias da emulsão B11 : (a) 24 horas após a manipulação (temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$); (b) após o ciclo gela/degela; (c) após 30 dias armazenada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); (d) após 30 dias armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$; (e) após 30 dias armazenada a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. (aumento de 400x). I : microscopia sem polarização; II : microscopia com luz polarizada	90
Figura 31- Fotomicrografias da emulsão D6d : (a) 24 horas após a manipulação (temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$); (b) após o ciclo gela/degela; (c) após 30 dias armazenada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); (d) após 30 dias armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$; (e) após 30 dias armazenada a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. (aumento de 400x). I : microscopia sem polarização; II : microscopia com luz polarizada	91
Figura 32- Representação gráfica do comprimento de onda (λ) <i>versus</i> absorvância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de cafeína a $2,0 \mu\text{g/ml}$ em tampão acetato de sódio $0,1\text{M}$ pH 5,5	92
Figura 33- Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) <i>versus</i> absorvância (ABS), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão acetato de sódio $0,1\text{M}$ pH 5,5 pela espectrofotometria	93
Figura 34- Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g/cm}^2$) <i>versus</i> tempo (horas) mostrando o perfil de liberação (1^a e 2^a fase) por diálise da cafeína a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c)	95
Figura 35- Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g/cm}^2$) <i>versus</i> $\sqrt{\text{tempo}}$ (horas) mostrando o perfil de liberação (pseudo 1^a ordem) por diálise da cafeína a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c)	95
Figura 36- Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g/cm}^2$) <i>versus</i> tempo (horas) mostrando o perfil de liberação (1^a e 2^a fase) por diálise da cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d)	96
Figura 37- Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g/cm}^2$) <i>versus</i> $\sqrt{\text{tempo}}$ (horas) mostrando o perfil de liberação (pseudo 1^a ordem) por diálise da cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d)	97
Figura 38- Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g/cm}^2$) <i>versus</i> tempo (horas) mostrando o perfil de liberação por diálise da cafeína e cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulações B11c e D6d, respectivamente)	97
Figura 39- Representação gráfica do comprimento de onda (λ) <i>versus</i> absorvância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de cafeína a $2,0 \mu\text{g/ml}$ em tampão borato pH 10,0	98

Figura 40- Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) <i>versus</i> absorbância (ABS), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão borato pH 10,0 pela espectrofotometria	99
Figura 41- Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) <i>versus</i> área do pico (mAU), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão borato pH 10,0 pela eletroforese capilar (CE)	100
Figura 42- Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) <i>versus</i> área do pico (mAU), em função da obtenção da curva de calibração do benzoato de sódio em tampão borato pH 10,0 pela eletroforese capilar (CE)	100

Resumo

RESUMO

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Atualmente, decorrente da cultura estética onde há o culto aos corpos esbeltos com aparência saudável e pele lisa, macia e viçosa, a hidrolipodistrofia ginóide, conhecida como celulite, tem sido um dos desafios para os dermatologistas e cirurgiões plásticos. Assim, tem-se testado diferentes formas de tratamentos entre as quais estão aplicações de cremes à base de xantinas visando a atenuação dos sintomas. O conhecimento das propriedades físico-químicas de tais formulações é essencial para otimizar as condições de produção e liberação do ativo na pele, além de prover elegância cosmética do produto desenvolvido. Os objetivos desse trabalho foram obter e avaliar a estabilidade de emulsões O/A contendo fase líquida cristalina, adicionada de cafeína, para aplicação no tratamento da hidrolipodistrofia ginóide, bem como avaliar o perfil de liberação da substância ativa *in vitro* com intuito de determinar sua disponibilidade. A emulsão O/A contendo como fase oleosa, óleos vegetais naturais (óleo de urucum, de café e de melaleuca) foi desenvolvida através da utilização do Sistema Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo (EHL). Utilizando os tensoativos não-iônicos *Ceteareth 5* e *Steareth 2* nas concentrações de 10,0 e 15,0% foi possível obter fases líquidas cristalinas lamelares. A adição de cafeína a 1,0% foi conseguida em emulsão contendo 15,0% da mistura de tensoativos e com auxílio na solubilização através do uso de benzoato de sódio na mesma concentração (1,0%). As emulsões foram consideradas estáveis segundo as condições experimentais e parâmetros analisados. O perfil de liberação da substância ativa apresentou fase inicial de liberação mais rápida seguida de outra mais lenta. A eletroforese capilar mostrou-se ferramenta mais adequada para quantificação do ativo. Os resultados sugerem que os cristais líquidos lamelares estejam atuando provavelmente como veículo de liberação lenta.

Palavras-chave: emulsões O/A, cristais líquidos, tensoativos não-iônicos, óleos vegetais, cafeína.

Abstract

ABSTRACT

MORAIS, G.G. **Development and evaluation of the stability of O/W emulsion with liquid crystals added of xantine to treatment of the gynoid hydrolipodystrophy (cellulite).** 2006. 158f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Nowadays, due to aesthetic culture that there is the cult to slim body with health appearance and smooth, vigorous skin, the gynoid hydrolipodystrophy, known as cellulite, has been one of the challenges for dermatologists and plastic surgeons. Thus, different kinds of treatments have been tested, and among them, the application of xantines-based creams in order to attenuate the symptoms. The knowledge of the physicochemical properties of such formulations is essential to optimize the production conditions and active skin delivery, besides promoting cosmetic elegance of the developed product. The aims of this research were to attain and to evaluate the stability of O/W emulsions containing liquid crystalline phase, with the addition of caffeine, to be used on the gynoid hydrolipodystrophy treatment, as well as evaluate the release profile of the active *in vitro* in order to determine its availability. The O/W emulsion containing natural vegetable oils (*annatto oil*, *coffee oil* and *tea tree oil*) as oily phase was developed through the utilization of Hydrophilic Lipophilic Balance System (HLB). When using the non-ionic surfactants *Ceteareth 5* and *Steareth 2* in the 10.0 and 15.0% concentrations it was possible to obtain lamellar liquid crystalline phases. The addition of caffeine 1.0% was attained in emulsion containing 15.0% of the surfactant mixture and its solubility was improved through the sodium benzoate use in the same concentration. The emulsions were considered stable according to the experimental conditions and evaluated parameters. The release profile of the active agent presented a faster initial phase followed by a slower one. The capillary electrophoresis showed a more suitable tool to quantify the active. The results suggest that the lamellar liquid crystals are probably acting as slow delivery vehicle.

Keywords: O/W emulsions, liquid crystals, non-ionic surfactants, vegetable oils, caffeine.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Embora a hidrolipodistrofia ginóide, mais conhecida como celulite, seja uma questão estética, afeta a saúde, principalmente das mulheres, pois o grau de ansiedade causado, referindo-se a auto-imagem, auto-percepção e auto-estima, muitas vezes chega a extremos e distorce a visão que as pessoas têm de si mesmas, podendo chegar a um nível de preocupação e desgaste físico e emocional elevado, além de muitas recorrerem à alternativas muitas vezes prejudiciais a própria saúde (GOLIK, 1995).

Dentre as formas atualmente procuradas para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide, encontram-se emulsões contendo ativos indicados para a modificação e minimização dos sintomas desta alteração histofisiológica da pele. Segundo alguns estudos, tem sido demonstrado que as metilxantinas, tais como a cafeína, têm ação sobre a lipólise melhorando a aparência da hidrolipodistrofia ginóide (DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004; LESSER *et al.*, 1999).

Entretanto, reduções seletivas de depósitos de lipídeos requerem maior concentração de agentes ativos na área onde a lipólise deve ser maior. Para tal, com a aplicação tópica destes agentes, é necessário o carregamento dos ativos por meio da utilização de sistemas de liberação (DI SALVO, 1996).

Atualmente, o desenvolvimento da tecnologia cosmética não se restringe em apenas descobrir novas moléculas, mas também o desenvolvimento de novos sistemas para veicular substâncias ativas ou otimizar a liberação das mesmas.

No segmento cosmético as emulsões, principalmente O/A, são amplamente utilizadas como sistemas para liberação de ativos. A subdivisão das fases em gotículas e a formação da emulsão trazem como principais vantagens a maior facilidade de espalhamento, a possível potenciação da penetração, absorção e conseqüentemente atividade dos componentes em

função da ação emoliente de seus constituintes, a possibilidade de separação de compostos incompatíveis, de mistura de elementos não miscíveis e proteção a compostos quimicamente instáveis (SILVA & SOARES, 1996).

Entretanto, o efeito terapêutico total das preparações percutâneas não depende somente do agente, mas também da estrutura do veículo. Por esta razão, o estudo da microestrutura deste tipo de sistema é essencial para otimizar a formulação e a manipulação dos produtos (ECCLESTON, 1997).

Apesar das emulsões serem usualmente tratadas como dispersões de fase líquida, há evidência de que uma terceira fase está presente e alguns resultados mostram que a estabilidade e outras propriedades das emulsões são totalmente controladas por esta fase, que usualmente leva à formação de fases líquidas cristalinas (ALI & MULLEY, 1978).

Os cristais líquidos, denominados também de fase mesomórfica ou fase cristalina, são definidos como o estado intermediário entre sólido e líquido, apresentando características desses dois estados físicos (CIOCA & CALVO, 1990; TYLE, 1989) e representam a terceira fase da emulsão, não sendo definida como fase externa ou interna (BEVAQUA *et al.*, 1991). São formados espontaneamente na interface do óleo e da água agindo como estabilizante e são responsáveis pelo aumento da estabilidade e manutenção da hidratação, que pode ser obtida, pois estas estruturas contribuem na diminuição da perda de água transepidérmica, bem como pela modulação da liberação de ativos aprisionados na sua estrutura (BEVAQUA *et al.*, 1991).

Dentre os constituintes da fase oleosa de emulsões cosméticas, destacam-se os óleos vegetais, devido às propriedades como baixa viscosidade e massa molecular, o que os tornam menos oclusivos que os óleos minerais; com boa penetração na pele e capacidade de transporte de agentes terapêuticos, compatibilidade com a pele e possibilidade de fornecer nutrientes como ácidos graxos essenciais (SILVA & SOARES, 1996).

Assim, o desenvolvimento de emulsões com óleos vegetais é de grande interesse devido às atividades intrínsecas, à complexa composição de ácidos graxos e ao mercado potencial dos produtos naturais, que permite a utilização de matérias-primas da biodiversidade brasileira, acompanhando a tendência atual de utilização de produtos naturais.

Uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de sistemas emulsionados está relacionada à estabilidade, sendo um dos aspectos mais importantes no desenvolvimento e obtenção de um produto cosmético. Assim, a fim de evitar o desenvolvimento dos indesejáveis produtos instáveis e/ou ineficazes, são realizados os testes de estabilidade, pois estes podem prever a capacidade do produto em manter suas características originais e sua atividade. Dentre os testes de estabilidade físico-química mais empregados destacam-se características organolépticas, centrifugação, estresse térmico, comportamento reológico, medidas de pH e condutividade (CADWALLADER, 1989; IDSON, 1993b; RIEGER, 1996).

O presente trabalho se propôs a desenvolver e caracterizar emulsões O/A com fases líquidas cristalinas e cafeína como ativo, visando o tratamento da celulite. Foram realizados também testes de liberação da substância ativa *in vitro*, os quais fornecem dados importantes com relação à interação substância ativa *versus* formulação (CHORILLI, 2004).

Portanto, a elevada frequência da hidrolipodistrofia ginóide, principalmente na população feminina, faz com que a busca da saúde cutânea seja constante e na qual a tecnologia de cosméticos tem um dos seus maiores e relevantes desafios.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Pele

A pele não é um simples invólucro que recobre o nosso corpo, é uma fronteira ativa entre o organismo e o meio ambiente. Considerada como órgão verdadeiro, possui arquitetura complexa apresentando múltiplas e precisas funções. Constitui, antes de tudo, a primeira linha de defesa contra agressões do meio ambiente, não sendo de maneira nenhuma uma barreira intransponível (AZZINI, 1999; PEYREFITTE *et al.*, 1998; RANGEL, 1998).

É o órgão mais extenso do corpo humano e corresponde cerca de 5% do peso total corporal, apresentando variações de espessura e valor de pH de acordo com as regiões (PEYREFITTE *et al.*, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

A pele humana é composta por três camadas denominadas epiderme (camada mais superficial), derme (camada intermediária) e hipoderme ou tecido celular subcutâneo (camada profunda) (BENY, 2000; LEONARDI, 2004; PEYREFITTE *et al.*, 1998; RANGEL, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

Figura 1 – Estrutura geral da pele. Epiderme, derme e hipoderme (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

Epiderme

A epiderme, simplesmente chamada de pele, é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo a camada mais externa do tecido cutâneo (AZZINI, 1999). É um epitélio versátil, cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam periodicamente (VIGLIOGLIA, 1989).

Na pele espessa (por exemplo, nas palmas das mãos e nas plantas dos pés), podem ser distinguidas cinco camadas na epiderme. Começando da mais profunda em direção à superfície, há o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e o estrato córneo. O estrato lúcido não está presente na pele fina (LEONARDI, 2000).

Os queratinócitos, células que formam o epitélio estratificado pavimentoso, são elementos dominantes quanto ao número, representando 80% do conjunto das células epidérmicas. São responsáveis pela fabricação de queratina, que preenche as células mais superficiais da epiderme para formar a camada córnea, apresentando assim como função a construção da camada córnea (PEYREFITTE *et al.*, 1998). Essas células constituem um sistema dinâmico, ou seja, estão em constante renovação, desde sua junção com a derme (junção dermoepidérmica, onde se encontram as papilas dérmicas, que aumentam consideravelmente a superfície da junção) até a superfície cutânea, onde se efetua a descamação permanente (LEONARDI, 2000; PEYREFITTE *et al.*, 1998).

A queratinização da epiderme, processo de diferenciação celular que leva à formação das células córneas, compreende dois fenômenos: migração vertical das células surgidas da divisão das células basais e diferenciação destas células, durante sua viagem ascensional, para chegar à formação de células córneas (AZZINI, 1999; PEYREFITTE *et al.*, 1998).

Assim, essa diferenciação epidérmica se inicia no estrato basal, também chamado de estrato germinativo por conter células em divisão. As células recém-produzidas migram em direção às camadas superiores da epiderme, ou seja, da epiderme ao estrato córneo

modificando o seu comportamento substituindo aquelas que descamaram. Por ocasião de sua migração, sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas caracterizando, assim cada camada epidérmica (AZZINI, 1999; LEONARDI, 2000; PEYREFITTE *et al.*, 1998).

Estrato córneo

O conhecimento da estrutura e função do estrato córneo da pele humana progrediu muitas etapas a partir do conceito inicial de que era um tecido morto e sem função. Esta idéia seguiu a hipótese que considera o estrato córneo como um tecido consistente, impermeável e que seria útil apenas na proteção contra influências do meio externo. Um entendimento maior da natureza heterogênea do mesmo foi proporcionado por pesquisas posteriores, devido às quais se sabe que lipídeos segregados nos domínios intercelulares envolvem os corneócitos vazios, instituindo-se assim a teoria do “tijolo-reboco” (AZZINI, 1999).

O estrato córneo, camada mais superficial da epiderme é extremamente fino (20- 30 μm), possui células ricas em queratina, com ausência de núcleo e organelas, que estão empilhadas e encaixadas em arranjos ordenados (AZZINI, 1999; BENY, 2000; LEONARDI, 2000; VIGLIOGLIA, 1989).

Essa camada apresenta estrutura única composta de dois compartimentos que são representados por estruturas poliédricas interligadas, constituídas por material protéico (corneócitos anucleados) envolvidas por uma membrana embebida numa matriz lipídica intercelular, consistindo de elementos amorfos em contínua descamação, contendo apenas 10% de água (AZZINI, 1999; BENY, 2000; VIGLIOGLIA, 1989).

Os lipídeos intercelulares do estrato córneo, que são predominantemente colesterol, ácidos graxos e ceramidas, estão dispostos em camadas chamadas lamelas intercelulares e são fundamentais para a função barreira (AZZINI, 1999; FROEBE *et al.*, 1990; LEONARDI, 2000; PARK *et al.*, 2001).

Sua importância deve-se à disposição estratificada, ao alto conteúdo em lipídeos e queratina e ao baixo teor de hidratação, atuando assim na barreira epidérmica (BENY, 2000; VIGLIOGLIA, 1989). Embora seja uma membrana muito fina, comporta-se como eficiente barreira química e física, protegendo nosso corpo contra perda de água pela pele (desidratação), bem como impede a entrada de agentes infecciosos e tóxicos para a derme (BENY, 2000; LEONARDI, 2000; VIGLIOGLIA, 1989).

Segundo Beny (2000), o estrato córneo representa uma região importante no controle da absorção cutânea de substâncias ativas, pois a permeabilidade seletiva desta estrutura apresenta-se como tema central em muitos aspectos efetivos de substâncias ativas de uso tópico. Essa barreira, pouco permeável à água, retém água e eletrólitos. A retenção de água, que conserva a superfície da pele saudável e macia, é devido aos lipídeos de sua superfície, derivados principalmente do sebo, que aumentam a capacidade de retenção de água do estrato córneo, diminuindo sua evaporação (LEONARDI, 2000).

Derme

A derme, também denominada de tecido de sustentação, é um tecido conjuntivo denso constituído por células e por abundante matriz extracelular, que tem como funções nutrição e sustentação da epiderme (AZZINI, 1999; PEYREFITTE *et al.*, 1998). É neste tecido de sustentação, que é atravessado por inúmeros vasos e nervos, onde estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, pêlos e unhas. Considerada como verdadeiro “reservatório” de água é suscetível de armazenar, trocar e fornecer massas variadas de água em função das necessidades do organismo (PEYREFITTE *et al.*, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

Esta camada é constituída por dois tipos de células: fixas (fibroblastos) e “migratórias”. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese das diferentes macromoléculas

que se encontram na constituição da matriz extracelular, enquanto as células migratórias participam da defesa do organismo (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina, que se banham na substância fundamental, material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas, que são representadas pelos glicosanimoglicanos e glicoproteínas de estrutura (PEYREFITTE *et al.*, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

De acordo com as duas diferentes estruturas encontradas na derme, esta é dividida em derme superficial ou papilar e reticular ou córion. A derme superficial é representada pelas papilas dérmicas (região irregular de contato com a epiderme), onde há presença de finas fibras de colágeno (reticulina) e elásticas que estão organizadas em redes frouxas, sendo esta última fixa à junção dermoepidérmica. Contém capilares sangüíneos e linfáticos e numerosas terminações nervosas, sendo responsável pelas trocas nutritivas com as camadas mais profundas da epiderme. A derme reticular é o tecido de sustentação compressível, extensível e elástico da epiderme, formado por tecido conjuntivo denso, cujas fibras de colágeno formam feixes cada vez mais espessos em função da profundidade e entrelaçadas às fibras elásticas (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

Hipoderme

A hipoderme, camada mais profunda da pele também conhecida como camada subcutânea de gordura, é formada por uma variedade de tecido conjuntivo denominado de tecido adiposo, que entre outras funções, é responsável pelo armazenamento de nutrientes e energia para o organismo, modelando a silhueta corporal em função da idade, do sexo e do estado nutricional (PEYREFITTE *et al.*, 1998). Apresenta ainda como funções, proteção mecânica, pois se comporta como verdadeiro amortecedor que atua suavizando traumas e

isolante térmico, conservando a temperatura corporal (PEYREFITTE *et al.*, 1998; RANGEL, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

O tecido adiposo acumulado na hipoderme, também conhecido como panículo adiposo, apresenta espessura variável de acordo com sua localização (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

Peyrefitte *et al.* (1998), descrevem a constituição da hipoderme como sendo de lobos gordurosos limitados por feixes de fibras colagênicas provindas da derme, que se fixam nas aponevroses dos músculos ou no periósteo dos ossos, limitando assim a mobilidade da pele. Os lobos gordurosos são subdivididos em pequenos lóbulos gordurosos, pequenos compartimentos limitados por feixes conjuntivos, repletos de células gordurosas denominadas adipócitos. A hipoderme consiste fundamentalmente em uma arquitetura lobular adiposa, sulcada de septos fibrosos pelos quais transcorrem os vasos e nervos cutâneos de maior volume (RANGEL, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

Segundo Di Salvo (1996), os adipócitos estão organizados em câmaras de fios de tecido conjuntivo, localizando-se na rede fibrilar do tecido conjuntivo, entre a camada dérmica e a massa muscular (PEYREFITTE *et al.*, 1998) Essa camada intermediária, fortemente vascularizada, também contém fibras elásticas, proteoglicanos e colágeno (DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004).

Essas células apresentam como função reserva energética, que é feita através do armazenamento de lipídios sob forma de triglicérides, bem como o fornecimento de ácidos graxos em caso de necessidade energética (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

2.2. Celulite

É na hipoderme que se desenvolve a celulite, também denominada de hidrolipodistrofia ginóide, cujo termo científico significa: *hidro*, relativo a água e outros líquidos; *lipo*, de lipos, relativo à gordura; *distrofia*, que demonstra desordem nas trocas metabólicas do tecido; e *ginóide*, de gino + óide, onde *gino*, de guno, designa mulher e *óide*, de eidos, que denota forma de; sendo assim descreve as características e origens reais do problema (GOLIK, 1995; RANGEL, 1998).

Segundo Peyrefitte *et al.* (1998), o termo ginóide é devido à distribuição do panículo adiposo, diferente no homem e na mulher, que na mulher se localiza essencialmente na parte inferior do corpo abaixo do umbigo (região pélvica, nádegas, coxas), que é chamada de repartição ginóide. Enquanto que no homem predomina nas partes altas do corpo, sobretudo no abdômen, acima do umbigo, sendo chamada de repartição andróide.

Curri (1993) define celulite como “paniculopatia fibroesclerótica-edematosa”, ou seja, doença do tecido adiposo que desenvolve principalmente em mulheres, com sintomas clínicos de estase venosa ou insuficiência venosa nos membros inferiores.

Então, a hidrolipodistrofia ginóide é uma alteração genuína e loco-regional do panículo-adiposo subcutâneo, determinante do formato corporal característico da mulher, com perda do equilíbrio histofisiológico local (RANGEL, 1998).

A lipodistrofia, que traduz o aumento da espessura da camada subcutânea de gordura, pode ser descrita pela associação da hipertrofia e da hiperplasia dos adipócitos. A hipertrofia é caracterizada pelo aumento do volume das células adiposas, enquanto a hiperplasia refere-se ao aumento do número dessas mesmas células (BERTIN *et al.*, 2001; CURRI, 1993; RANGEL, 1998).

Os adipócitos normalmente ficam carregados de gordura sob a forma de triglicerídeos e liberam essa reserva lipídica de acordo com as necessidades metabólicas do organismo, ou então é removida devido a um processo dinâmico, no qual a gordura se hidrolisa em ácidos graxos e glicerol (PEYREFITTE *et al.*, 1998; RANGEL, 1998). Uma disfunção desse processo pode ocasionar o excesso de triglicerídeos, provocando acúmulo anormal de massa adipocitária, “depósitos de gordura localmente concentrados” ou “depósitos de gordura localizada”. Se estes depósitos comprimem o tecido circundante, a microcirculação venosa e linfática pode diminuir, juntamente com as macromoléculas envolvidas no transporte linfático (**Figura 2**) (DI SALVO, 1996).

Figura 2 – Estrutura da pele normal e com celulite (COMO SE DESENVOLVE A CELULITE, 2005).

Na década passada houve uma intensa pesquisa para esclarecer este assunto e muitos autores concordaram nos seguintes pontos: as células adiposas alargam, devido ao acúmulo de gordura; as paredes capilares tornam-se excessivamente permeáveis causando o acúmulo de fluidos; a drenagem linfática insuficiente retarda a eliminação do excesso de fluidos; as células adiposas agrupam-se e ficam ligadas por fibras de colágeno, e dificultam o retorno da circulação sanguínea; os fios de tecido conjuntivo endurecem, contraem-se e tracionam a pele para baixo. O resultado é o aspecto irregular da pele, como “casca de laranja”, que se deve a mudanças na corrente sanguínea, drenagem linfática, gordura e tecido conjuntivo (BERTIN *et al.*, 2001; CURRI, 1993; LESSER *et al.*, 1999; QUERLEUX *et al.*, 2002; SMITH, 1995).

Assim, esta disfunção do metabolismo dos lipídeos e, em particular, da lipólise pode ser provocada por diversos fatores que, geralmente atuam em conjunto. Podem ser hormonais, genéticos, nutricionais, psíquicos ou circulatórios, sendo divididos como principais e secundários ou fatores auxiliares (GOLIK, 1995; LEONARDI, 2004; RANGEL, 1998). Dentre estes, os hormônios têm importância especial, pois a celulite desenvolve-se durante períodos de mudanças hormonais, como puberdade e menopausa; além disso, alterações na circulação sanguínea, drenagem linfática, gordura e tecido conjuntivo também são comandados por hormônios. Relacionam-se ainda com retenção de líquidos, características individuais do metabolismo e fatores hereditários (CURRI, 1993; ROSEMBAUM *et al.*, 1998).

Ao contrário do que se diz a celulite não está relacionada com a obesidade, pois os depósitos de gordura podem ocorrer até em pessoas de peso normal ou magra, principalmente nos quadris e coxas (DI SALVO, 1996).

Por outro lado, o aparecimento da celulite é mais acentuado nas mulheres e é encontrada muito raramente nos homens, devido à diferença inerente na estrutura do tecido conjuntivo subjacente. Os homens possuem arranjo mais difuso do tecido conjuntivo, as câmaras estão organizadas diagonalmente em pequenas unidades e que, além de acumularem menos gordura, não resultam em celulite. Nas mulheres, a estrutura subcutânea está organizada em câmaras verticais e, portanto permitem acumular mais gordura, apresentando organização quase semelhante a um colchão, na região de contato entre a derme e a hipoderme, com diminutos filamentos paralelos que ligam a pele à estrutura subjacente (**Figura 3**). Onde estes filamentos ancoram a pele, podem aparecer os característicos bolsões, tipo casca de laranja ou depressões de celulite (DI SALVO, 1996; QUERLEUX *et al.*, 2002; ROSEMBAUM *et al.*, 1998).

Figura 3 – Organização das células na hipoderme do homem e da mulher (DIFERENÇA ENTRE HOMEM E MULHER, 2005).

Em geral, o excesso de gordura subcutânea pode causar contorno físico irregular em áreas específicas do corpo que são percebidas como não saudáveis e de má aparência (LESSER *et al.*, 1999).

Tratamento

Desde há muito tempo, dermatologistas e cirurgiões plásticos buscam solução para os casos de hidrolipodistrofia ginóide, porém ainda não há forma de tratamento que possa afirmar totalmente eficaz. Existem diferentes terapias disponíveis, porém a falta de tratamento definitivo tem feito com que os pesquisadores testem várias opções terapêuticas, sendo a maioria desses tratamentos na forma de cremes e géis cosméticos. Esses cremes tópicos utilizados para modificar a gordura subcutânea têm sido extensamente comercializados nos últimos anos. Dentre esses produtos disponíveis vários se baseiam na cafeína (LESSER *et al.*, 1999).

Atualmente acredita-se que a lipólise seja mediada em parte pelo sistema nervoso, através da ação de receptores α_2 e β -adrenérgicos que se encontram na superfície da membrana das células adiposas (DI SALVO, 1996).

Estudos *in vitro* mostram que o agente ativador dos receptores β -adrenérgicos estimula a lipólise ou reduz o tamanho das células de gordura, enquanto outro agente que ativa receptores α_2 -adrenérgicos inibe a lipólise. Um estimulador β -adrenérgico e outro inibidor α_2 -

adrenérgico ou suas combinações, incentivam a lipólise. Além disso, um inibidor α_2 -adrenérgico pode permitir a lipólise mesmo na presença de agente que estimule tanto os receptores adrenérgicos β como α_2 . Quando os receptores β são ativados, essas células vencem a resistência à liberação de gordura pelos receptores α_2 . (DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004).

Tem sido demonstrado que os agonistas do β -adrenérgico podem inibir a fosfodiesterase que, por sua vez, emite AMP cíclico (monofosfato de adenosina cíclico ou AMPc) ou aumentar diretamente os níveis de AMPc intracelular e estimular a lipólise. No adipócito, AMPc desencadeia a hidrólise de triglicerídeos com liberação dos ácidos graxos livres (BERTIN *et al.*, 2001; DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004; LESSER *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual as metilxantinas, tais como a aminofilina e cafeína, modificam as camadas subcutâneas ainda não está esclarecido. Entretanto, existem pesquisas que mostram que metilxantinas causam lipólise ou hidrólise do tecido adiposo em radicais de ácidos graxos livres. Acredita-se também que os processos endocitóticos pelos quais a cafeína é absorvida na célula estimulam a liberação de sódio (bomba de sódio) no fluido extracelular, causando desidratação intracelular (LESSER *et al.*, 1999).

Além disso, segundo Lesser *et al.* (1999), a incapacidade para assegurar que as metilxantinas sejam liberadas nas camadas subcutâneas apropriadas tem contribuído muito para os escassos resultados vistos no passado com cremes baseados em aminofilina e cafeína.

A diminuição seletiva e bem sucedida dos depósitos de células de gordura, via liberação tópica, exige o carregamento do agente ativo, para que seja obtida concentração mais elevada na área de depósito adiposo onde se procura obter a lipólise. Essa liberação pode ser auxiliada pelo uso de sistemas de liberação, como microparticulados ou algum outro mecanismo semelhante de veículo intensificador do carregamento, visando alcançar o tecido (DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004).

Portanto, a utilização de produtos tópicos requer formulação adequada para os ativos a fim de atingir o objetivo desejado, ou seja, transpor as barreiras epidérmicas.

Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), bem como a teofilina e aminofilina, são estimulantes β -adrenérgicos e, assim são chamados de agentes lipolíticos (DI SALVO, 1996).

É uma metilxantina que estimula o sistema nervoso central. Alcalóide que ocorre naturalmente e aparece em plantas distribuídas geograficamente de maneira ampla, encontrada comumente nas folhas de chá, grãos de café, grãos de cacau, no guaraná, na cola e na erva-mate (MARTINDALE, 1996; ROBBERS *et al.*, 1997; TANO, 2003; THE MERCK INDEX, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975).

Pelo menos metade da população do mundo consome chá contendo cafeína, preparado das folhas de *Thea sinensis*, arbusto nativo no sul da China e cultivado em outros países. A cola é importante pelo teor de cafeína e por seu aroma, e seu principal uso nos Estados Unidos é na fabricação de bebidas não alcoólicas. Nos países tropicais onde é nativa, sua noz fresca é mascada como estimulante. O café, a fonte mais importante da cafeína na dieta norte-americana, é extraído do fruto da *Coffea arabica* e espécies correlacionadas (PERI-OKONNY *et al.*, 2005; ROBBERS *et al.*, 1997; TANO, 2003). A base da popularidade de todas as bebidas que contém cafeína é a antiga crença de que têm ações estimulantes e anti-soporíferas que melhoram o temperamento, diminuem a fadiga e aumentam a capacidade de trabalho (TANO, 2003). Numerosos medicamentos anti-gripais e antialérgicos ou formulações relacionadas também contém cafeína (PERI-OKONNY *et al.*, 2005).

A cafeína, em 1958, foi reconhecida pelo FDA (Food and Drug Administration) como geralmente segura (TANO, 2003). The Merck Index (2001) denomina *Caffeine; anhydrous caffeine; 1,3,7-trimethylpurine-2,6(3H,1H)-dione; 1,3,7-trimethylxanthine*, com fórmula

molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e PM 194,19, é anidra e contém uma molécula de água de hidratação (**Figura 4**).

Figura 4 – Fórmula estrutural da cafeína (THE MERCK INDEX, 2001).

Ocorre como pó ou cristais brancos macios, sem odor, gosto amargo, comumente aglomerado (MARTINDALE, 1996; ROBBERS *et al.*, 1997; THE MERCK INDEX, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975). Fracamente solúvel em água, muito solúvel em clorofórmio, levemente solúvel em éter. A solubilidade em água é aumentada por salicilatos ou citratos, cinamatos, benzoatos álcali, ácido cítrico (MARTINDALE, 1996; ROBBERS *et al.*, 1997; TANO, 2003; THE MERCK INDEX, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975). Compostos medicinais são constituídos por cafeína citrada e por cafeína com benzoato de sódio, este último utilizado na proporção 1:1 em injetáveis aquosos (ROBBERS *et al.*, 1997; TANO, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975).

Em formulações cosméticas recomenda-se que a concentração de uso seja limitada em 8,0% para cafeína e 4,0% para as demais xantinas, isoladas ou associadas, segundo parecer da Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC, 2001) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (TANO, 2003).

2.3. Emulsões

A palavra emulsão deriva o latim *emulgeo*, que significa mungir, aplicando-se de modo geral, a todas as preparações de aspecto leitoso com as características de um sistema disperso de duas fases líquidas. O emprego da forma emulsão como veículo para preparações de uso tópico deriva do primeiro “cold cream” criado por Galeno, sendo historicamente a forma mais antiga de aplicação cosmética (AZZINI, 1999; LOCHHEAD *et al.*, 1986; PRISTA *et al.*, 1981; RANGEL, 1998).

Emulsões são preparações farmacêuticas- cosméticas, geralmente descritas como sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, constituídos por uma fase interna, dispersa ou ainda conhecida como descontínua e por uma fase externa, contínua ou dispersante (AZZINI, 1999; PRISTA *et al.*, 1981; RIBEIRO, 2002). Em geral, se apresentam estáveis durante a armazenagem e “se quebram” ao contato com a pele, possibilitando a liberação da fase descontínua (SILVA & SOARES, 1996).

São constituídas por três componentes principais: a fase aquosa, a fase oleosa e um sistema adequado de emulsificantes para manter as fases dispersadas, e classificadas de acordo com a natureza da fase externa. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, estes sistemas podem ser classificados como óleo em água (O/A), que é quando óleo encontra-se disperso sob a forma de pequenas partículas na fase aquosa, ou como água em óleo (A/O) quando a água está dispersa na fase oleosa da emulsão (AZZINI, 1999; KNOWLTON & PEARCE, 1996; SILVA & SOARES, 1996). As emulsões do tipo O/A são quantitativamente mais utilizadas, devido ao seu aspecto menos oleoso, mais agradável aplicação tópica (SILVA & SOARES, 1996).

Devido à alta instabilidade das emulsões, a manutenção da fase dispersa na contínua depende da presença de adjuvantes como substâncias tensoativas com propriedades

emulgentes ou agentes emulsionantes, que formam uma película interfacial proporcionando aumento da estabilidade física e manutenção das fases interna e externa (AZZINI, 1999; RIBEIRO, 2002; SILVA & SOARES, 1996).

Portanto, de acordo com Ayannides & Ktistis (2002), o processo de dispersão é possível devido à adição de tensoativos, que mantêm a estabilidade criando uma camada hidratada nas partículas hidrofóbicas em emulsões O/A.

Os agentes emulsionantes são moléculas constituídas por uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (lipofílica) razoavelmente equilibradas, denominados de anfifílicos, que atuam reduzindo a tensão interfacial. Como resultado desta estrutura anfifílica, na presença de água e óleo, atraem as partes oleosa e aquosa do sistema, residindo preferencialmente na interface com seus grupos orientados para as respectivas fases nas quais é solúvel (AZZINI, 1999; RIBEIRO, 2002; SILVA & SOARES, 1996).

Atuam na formação de emulsões através de diferentes mecanismos, como redução da tensão interfacial favorecendo a estabilização termodinâmica; formação de um filme rígido interfacial, favorecimento da permanência de barreira mecânica que se opõe a coalescência; formação de uma dupla camada elétrica na superfície dos glóbulos, o que apresenta barreira elétrica que evitará a aproximação das partículas (SILVA & SOARES, 1996).

Segundo Azzini (2000), a natureza da interface é fator decisivo na estabilidade da emulsão, e por isso, a escolha adequada do(s) tensoativo(s) é muito importante.

Sistema EHL

A escolha dos agentes emulsificantes para o preparo de emulsão foi realizada durante muito tempo por métodos empíricos e experimentais. Para sistematizar esta escolha, Griffin desenvolveu o sistema do Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo (EHL) e este conceito tem sido usado

por mais de 20 anos para a seleção de tensoativos (KNOWLTON & PEARCE, 1996; PRISTA, 1981).

O sistema EHL representa o balanço do tamanho e força desses dois grupos e traduz as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um composto anfifílico em termos de escala numérica, segundo a qual são atribuídos valores de EHL que vão aumentando à medida que a substância se torna mais hidrofílica (FOX, 1986; PRISTA, 1981; SILVA & SOARES, 1996).

Assim, a proporção entre estes grupos determina o comportamento do tensoativo no processo de emulsificação. A ação desejada dos tensoativos em função dos valores de EHL determina sua aplicação, que segundo Griffin (PRISTA, 1981), aqueles com valores baixos de EHL são aconselhados para emulsões água em óleo (A/O) e com valores intermediários são recomendados para sistemas inversos óleo em água (O/A) (AZZINI, 1999; FOX, 1986; KNOWLTON & PEARCE, 1996; PRISTA, 1981; SILVA & SOARES, 1996).

Portanto, a classificação pelo EHL permite alguma predição do comportamento a ser esperado e reduz o volume de experimentos envolvidos na seleção empírica de emulsificantes (PRISTA, 1981; SILVA & SOARES, 1996).

O sistema de EHL auxilia na determinação da proporção correta da mistura dos tensoativos para a emulsificação, através do emprego de fórmulas matemáticas para a determinação do valor de EHL exigido pela formulação ou da mistura dos mesmos (AZZINI, 1999). Assim, o EHL requerido para emulsificar um óleo em particular, pode ser determinado pela preparação de uma bateria de emulsões com emulsificantes apropriados, numa faixa de valores de EHL conhecidos. O valor de EHL em que foi obtida a emulsão estável será considerado como valor de EHL do óleo (KNOWLTON & PEARCE, 1996; SANCTIS, 1999; SILVA & SOARES, 1996).

Santos *et al.* (2005) desenvolveram emulsões com cristal líquido contendo óleo de calêndula como fase oleosa e mistura de tensoativos lipofílicos e hidrofílicos a partir da utilização do sistema EHL.

Estabilidade das emulsões

A instabilidade física de um sistema disperso, em particular, das emulsões é causada pela separação de fases, promovendo mudança considerável na aparência, na consistência, na redispersibilidade e na “performance” do produto (IDSON, 1993a). Este tipo de instabilidade pode apresentar-se sob vários mecanismos, tais como, a cremeação, a sedimentação, a floculação ou a coalescência. Pode resultar ainda, da instabilidade química como, alteração dos valores de pH, hidrólise de tensoativos, contaminação microbiana e processos fotoquímicos (AZZINI, 1999).

Reações de hidrólise de tensoativos em valores altos ou baixos de pH, processos fotoquímicos, destruição microbiana de componentes da emulsão, eletrólitos, calor ou frio, embalagens não adequadas e estresse mecânico durante o transporte também são fatores que aceleram a separação das emulsões. A instabilidade pode ocorrer ainda, devido à inversão de fases provocada pela perda de água e conseqüente variação da relação entre as fases dispersa e contínua (SILVA & SOARES, 1996).

Entende-se por cremeação o fenômeno em que as gotículas da emulsão tendem a se separar do corpo da emulsão, sedimentando ou emergindo, dependendo da diferença de densidade entre as fases, sendo que a floculação é a adesão reversível das gotículas, com manutenção do filme interfacial e da individualidade formando rede bidimensional, sem coalescência, e a coalescência é o processo de separação durante o qual as gotículas emulsificadas se juntam, formando gotículas maiores que se separarão completamente da fase externa (SILVA & SOARES, 1996).

O objetivo principal dos programas e técnicas para estudar a estabilidade das emulsões, é prever a “vida útil” dessas emulsões em condições normais de armazenamento. Assim, tenta-se constantemente prever a vida útil da emulsão com base nos programas e técnicas do teste acelerado. Para reduzir o tempo exigido pelos testes de previsão de estabilidade, os formuladores submetem seus preparados a condições que tensionam a estabilidade do produto (RIEGER, 1996).

Os testes de estabilidade, em condições específicas e controladas para acelerar o envelhecimento, avaliam a capacidade de um produto em manter seu aspecto original, as características físicas, químicas e microbiológicas. Este tipo de teste pode fornecer antecipadamente uma indicação dos problemas que poderão ocorrer nas formulações (AZZINI, 1999).

Estudos de estabilidade devem ser realizados durante as diferentes etapas do desenvolvimento da formulação a fim de fornecer dados que irão permitir a seleção do produto que será seguro, estável e efetivo. Um programa de triagem da formulação e estabilidade bem planejado durante a fase de desenvolvimento pode auxiliar na seleção eficiente do produto cosmético proposto. Estudos de estabilidade acelerados para analisar variáveis de formulações diferentes podem ser úteis como procedimentos eficientes para propósito de triagem e avaliação. Alterações como precipitação de componentes das emulsões e alteração das propriedades reológicas terão impacto desfavorável na comercialização de um produto (CADWALLADER, 1989).

Segundo Rieger (1996), para a rápida avaliação da estabilidade da emulsão, as condições de estresse mais utilizadas são a centrifugação e a temperatura. O teste de centrifugação é de grande interesse já que possibilita informação muito rápida e comparável sobre as propriedades de estabilidade de diferentes emulsões (WITTERN *et al.*, 1985).

A centrifugação permite verificar a estabilidade, possibilitando observar rapidamente a separação de fases da dispersão, avaliando a coalescência ou a cremeação, podendo dessa forma, prever se o produto irá separar em função do tempo. É uma ferramenta que permite avaliar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas das formulações. Neste teste, pode-se constatar rapidamente a separação das fases da dispersão avaliando a coalescência ou cremeação exibidas pelas formulações (AZZINI, 1999; CADWALLADERR, 1989; IDSON, 1993b; SILVA & SOARES, 1996). Esta técnica é útil somente para emulsões fluidas submetidas à processos de separação numa faixa de forças produzidas em centrífugas laboratoriais (AZZINI, 1999).

Dentre os testes de temperatura, encontram-se os testes de estresse térmico e Teste de Estabilidade Acelerada (TEA). O teste de estresse térmico proposto por Braconi *et al.* (1995) emprega a temperatura como condição de estresse sobre a formulação possibilitando antever possíveis alterações que poderão ocorrer no decorrer do teste de estabilidade, e pode ser considerado de realização rápida (AZZINI, 1999; RIEGER, 1996).

Os Testes de Estabilidade Acelerada (Envelhecimento Acelerado) utilizam condições como variações de tempo e temperatura para acelerar o envelhecimento dos produtos, e interferem na estabilidade das emulsões de diferentes formas, incluindo mudanças na viscosidade das fases líquidas, partição das moléculas nas fases da emulsão, fusão de vários materiais (particularmente ceras) e hidratação de polímeros e colóides (AZZINI, 1999; IDSON, 1993b). Estes fornecem subsídios valiosos, que são orientativos principalmente na fase de desenvolvimento dos produtos.

Outras metodologias têm sido descritas para estudar a estabilidade das emulsões, como a avaliação da viscosidade e do comportamento reológico. De acordo com Azzini (1999), a viscosidade de uma emulsão é dependente da viscosidade de sua fase externa, das proporções entre fase interna e externa e também do tamanho das partículas dispersas na fase

contínua. Em muitas emulsões, também depende do ponto de fusão dos componentes da fase interna, e do tipo e da concentração do emulsificante.

A estabilidade do sistema emulsionado pode ser analisada pela lei de Stokes, que descreve a velocidade de sedimentação das gotículas. Um dos fatores envolvidos na sedimentação, e conseqüente desestabilização é a viscosidade da fase contínua da mesma; todavia, não é o mais importante, sendo também a redução do tamanho das gotículas e respectiva uniformidade de distribuição do tamanho, de grande importância para a manutenção da estabilidade física do sistema emulsionado. Entretanto, um elevado valor de viscosidade da fase contínua diminui a tendência da emulsão em separar-se (AZZINI, 1999; PRISTA, 1981; SILVA & SOARES, 1996;).

O perfil reológico de um produto cosmético é um dos seus mais importantes aspectos tanto em nível técnico quanto estético. Frequentemente as propriedades reológicas estão diretamente relacionadas aos atributos sensoriais do produto e a sua performance. A relação entre reologia e estabilidade, especialmente no caso de emulsões, tem sido reconhecida como parâmetro importante na formulação do produto. (TAMBURIC, 2000).

A determinação da condutividade elétrica das formulações é um excelente teste para se determinar o tipo de emulsão a analisar. É também, uma técnica frequentemente utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa, principalmente daquelas armazenadas por longos períodos (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998; LATREILLE & PAQUIN, 1990). A condutividade é dependente da natureza da fase externa da formulação. Portanto, se a emulsão é do tipo O/A, é boa condutora, mas se é tipo A/O, é má condutora (AZZINI, 1999; MASSON, 2005).

Outro teste importante e frequentemente realizado para monitorar a estabilidade de emulsões é a determinação do valor do pH, pois proporciona informações sobre a integridade das fases da emulsão e, também permite ajustá-lo ao valor de pH ótimo de ação de

componentes presentes na formulação, assim como àquele da pele. Quando se aplica à pele qualquer produto que possua valor de pH diferente, alteram-se as condições fisiológicas da pele, expondo-a a uma situação adversa (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

Com o objetivo de manter o equilíbrio da pele, as emulsões podem ser ajustadas a um valor de pH semelhante ao da pele, desde que, este tamponamento não influencie nas propriedades terapêuticas desta emulsão (AZZINI, 1999).

2.4. Cristais líquidos

A história dos cristais líquidos vem de cem anos atrás (1857-1927), quando o Professor Friedrich Reinitzer observou algo incomum sobre uma substância chamada benzoato de colesterila durante processos de fusão (CIOCA & CALVO, 1990). Os cristais líquidos são conhecidos desde 1889, quando Lehmann os descreveu como o estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o estado líquido. Em 1922, G. Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (mesos: intermediário; morphé: forma) para definir este quarto estado da matéria (TYLE, 1989). A transição normal segue o seguinte esquema:

Esta fase intermediária apresenta propriedades características de sólidos e líquidos, possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos, ou seja, esta mesofase tem propriedades mecânicas típicas do estado líquido, fluidez e tensão de superfície, mas certa ordem molecular e dessa

forma constitui uma fase fluida ordenada ou cristal líquido, termo usado para substâncias que passam por esta fase mesomórfica. A mesofase cristal líquido exibe ainda propriedades ópticas típicas do estado cristalino, anisotropia (direção óptica), birrefringência (BEVACQUA *et al.*, 1991; CIOCA & CALVO, 1990; NESSEEM, 2001; TYLE, 1989).

Algumas das propriedades apresentadas pelos cristais líquidos são semelhantes aos dos sistemas biológicos. Tais propriedades são tipicamente características de células biológicas. Em 1933, Bernard indicou que, na realidade, a célula biológica é um cristal líquido (CIOCA & CALVO, 1990). A membrana celular é um cristal líquido isotrópico, na qual os fosfolípidos são as moléculas anfífilas e a água é o solvente (BEVACQUA *et al.*, 1991).

A fase líquida cristalina é termodinamicamente estável e representa o estado de fusão incompleto. A maioria dos compostos que apresentam este comportamento tem moléculas alongadas e possuem um ou mais grupos polares. Tais moléculas tendem a arranjar-se paralelamente, mantendo-se próximas por forças de atração de Van der Waals (CIOCA & CALVO, 1990; KLEIN, 2002; TYLE, 1989).

Os cristais líquidos são divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. A classe termotrópica dos cristais líquidos é formada pela influência da temperatura do sistema e são pouco estáveis. São substâncias orgânicas com estrutura molecular simbolizada pelos ésteres colestéricos (CIOCA & CALVO, 1990; TYLE, 1989).

Os termotrópicos são classificados em nemáticos ou esméticos. Os nemáticos têm estruturas como linhas quando observado no microscópio, e as suas moléculas mantêm arranjo paralelo ou aproximadamente paralelo. A estrutura dos esméticos é estratificada, com as moléculas arranjadas em camadas e seus eixos longos dispostos paralelos uns aos outros (TYLE, 1989).

A classe liotrópica depende da concentração de um material, um solvente, que tenha papel ativo, crítico na estrutura destes cristais líquidos e não simplesmente um veículo para as

moléculas de tensoativos, ao contrário, é mais propriamente uma parte integrante da estrutura cristalina líquida (BEVACQUA *et al.*, 1991).

É formada quando certos compostos, geralmente agentes tensoativos, são tratados com solvente polar, mais comumente água (CIOCA & CALVO, 1990; TYLE, 1989). A interação fraca entre este agente tensoativo anfifílico e moléculas de solvente determina a formação de estruturas associadas e organizadas chamadas de cristais líquidos liotrópicos (TYLE, 1989).

Alguns tensoativos catiônicos e não-iônicos são capazes de formar fases anisotrópicas quando são tratados com solventes, e em particular com a água. Destas, as fases mais importantes e comumente observadas são as fases lamelar (“Neat Phase”), hexagonal (“Middle Phase”) e cúbica (“Cubic Phase”) (TYLE, 1989).

A fase hexagonal (“Middle Phase”) normalmente apresenta um centro lipofílico rodeado por uma camada interfacial de grupos polares hidratados. A fase cúbica (“Cubic Phase”) apresenta moléculas organizando-se de forma esférica e em cubos. Um tipo de arranjo esférico tem a porção polar da molécula sobre a superfície e a porção apolar está dirigida para o centro da esfera. As regiões polares interagem com a água, originando o arranjo cúbico. É uma estrutura opticamente isotrópica. A fase lamelar (“Neat Phase”) normalmente consiste de camadas duplas de tensoativos com os grupos polares introduzindo-se nas camadas aquosas. As cadeias hidrocarbônicas encontram-se no estado líquido e as bicamadas anfifílicas estão separadas por camadas de água. Uma característica notável desta fase é sua fluidez relativa apesar do alto conteúdo de tensoativos; e assim as lamelas podem deslizar facilmente umas sobre as outras. A adição de excesso de água aumenta o espaço interlamelar e pode eventualmente resultar numa fase cúbica (MASSON, 2005; SILVA JUNIOR, 2000; TYLE, 1989).

Figura 5 – Estruturas das fases líquidas cristalinas liotrópicas. (a) fase hexagonal, (b) fase lamelar, (c) fase cúbica (LOCHHEAD, 1994; TYLE, 1989).

Segundo Tyle (1989) é evidente que todas estas estruturas mesomórficas exibem as características estruturais de regiões polares num meio hidrofílico e regiões apolares num meio lipofílico (hidrofóbico). As fases mesomórficas podem ser representadas como o esquema abaixo:

Identificação dos cristais líquidos

Dentre as várias técnicas físico-químicas usadas para identificar as fases mesomórficas, tais como, difração de raios-X, reologia, ressonância magnética nuclear e calorimetria, a mais amplamente usada é a microscopia de luz polarizada (CIOCA & CALVO, 1990; MASSARO *et al.*, 2003; TYLE, 1989).

Segundo Bevacqua *et al.* (1991), os cristais líquidos são facilmente detectados quando observados sob polarizadores cruzados devido à birrefringência.

A birrefringência, também chamada de dupla refração, é encontrada em cristais líquidos ou qualquer sistema anisotrópico (CIOCA & CALVO, 1990).

Propriedades dos cristais líquidos

Dentre os tipos de cristais líquidos encontrados nos produtos cosméticos, os liotrópicos são os mais predominantes e formam-se espontaneamente em muitos tipos de sistemas emulsionados (BEVACQUA *et al.*, 1991).

A utilização de cristais líquidos em cosméticos apresenta vantagens funcionais, tais como, estabilizarem emulsões; promoverem liberação controlada de ativos; incorporação de ativos em matrizes cristalinas líquidas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os cristais líquidos protegem as substâncias ativas sensíveis contra a degradação térmica ou fotodegradação; promovem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (BEVACQUA *et al.*, 1991).

O aumento na estabilidade de emulsões se dá pela formação de multicamadas ao redor das gotículas da emulsão (fase líquida cristalina na interface), que atuam como barreira reológica contra a coalescência (BRINON *et al.*, 1998; DAHMS, 1986; KLEIN, 2002; NESSEEM, 2001; TYLE, 1989). A fase líquida cristalina ao redor das gotículas é altamente viscosa, e tem estrutura ordenada e baixa tensão interfacial (NESSEEM, 2001). Durante o processo de floculação e coalescência a força de atração de Van der Waals tem papel decisivo no direcionamento das partículas. Essa estrutura líquida cristalina multilamelar forma um filme entre as gotículas na floculação, chamado de “efeito estabilizante” (“retardation effect”) (TYLE, 1989).

As fases de cristal líquido também têm tendência para formar uma rede semi-sólida prolongando-se através da fase contínua da dispersão. Esta rede diminui o movimento das gotículas e exibe comportamento viscoelástico (NESSEEM, 2001; TYLE, 1989). Entretanto,

a força de Van der Waals é responsável principalmente pela estabilidade pronunciada das emulsões contendo cristais líquidos no processo de coalescência (TYLE, 1989).

Os cristais líquidos auxiliam no processo de liberação controlada por prevenir a liberação rápida do ativo dissolvido na fase líquida dispersa das emulsões. Este efeito é devido à estrutura multilamelar do cristal líquido ao redor das gotículas, que reduz efetivamente o transporte interfacial do ativo dissolvido dentro das gotículas (TYLE, 1989). As substâncias aprisionadas serão liberadas mais lentamente (liberação modificada) a partir dessa matriz do que a partir de solventes lipofílicos aplicados à superfície da pele, devido à interação entre o cristal líquido e o estrato córneo (BEVACQUA *et al.*, 1991; CIOCA & CALVO, 1990).

Devido à considerável capacidade solubilizante dos tensoativos, tanto de compostos lipossolúveis quanto de hidrossolúveis, os cristais líquidos têm apresentado grande interesse como nova forma cosmética. São usados também como excipientes para proteger substâncias sensíveis, tais como vitaminas, antioxidantes e óleos.

Uma outra propriedade de grande importância e destaque dos cristais líquidos na cosmetologia tem sido a manutenção da hidratação cutânea com a aplicação de produtos que contribuem na diminuição da perda de água transepidérmica. Hoje, já é conhecido que alguns lipídeos do espaço intercelular, como as ceramidas, assumem a forma de estruturas lamelares contribuindo, desta forma, para hidratação cutânea (FERRARI, 2002).

A estrutura multilamelar pode atuar como modulador específico para a retenção de água no estrato córneo, promovendo a hidratação da pele. Com bases nestas descobertas têm-se procurado desenvolver produtos para cuidados da pele contendo estruturas lipídicas que possam promover a formação de cristais líquidos (IWAI *et al.*, 1998; NESSEEM, 2001).

Portanto, os cristais líquidos têm considerável influência na estrutura microscópica e nas propriedades físico-químicas, por exemplo, viscosidade/reologia, na estabilidade e poder dispersante e solubilizante (ENGELS & RYBINSKI, 1998).

2.5. Óleos vegetais

Generalidades

Componentes naturais tais como óleos derivados de plantas e animais têm sido muito utilizados em formulações cosméticas. Por muitos anos, óleos vegetais foram usados em produtos para a pele, baseado na crença de que a aparência, como a elasticidade e função barreira da pele possam ser controlados pelos mesmos. A validade desta suposição foi aceita até a metade do século XX, quando foi demonstrado que a pele saudável e suas propriedades fisiológicas dependiam da presença e retenção de água na epiderme (AZZINI, 1999).

O teor de hidratação é um dos fatores mais importantes para se manter as condições ideais da pele. Por esta razão é que a maioria dos produtos cosméticos e dermatológicos contém, em suas fórmulas substâncias emolientes capazes de auxiliar na hidratação do estrato córneo (LEONARDI, 2000).

Quase todos os óleos vegetais apresentam emoliência, oclusividade, adesividade, brilho e solvência, diferenciando-se por sua constituição química, que pode promover efeitos bioquímicos diversos na pele (AZZINI, 1999).

Os óleos vegetais obtidos de plantas podem ocorrer em várias partes das mesmas, porém as sementes contêm quantidades maiores, sendo a fonte usual. São compostos principalmente por triglicérides, ésteres triplos de ácidos graxos e de glicerol. O ácido graxo que participa da formação destes ésteres é em sua maioria o ácido oléico, mas determinados

óleos contêm ácidos graxos mais insaturados, tais como, o ácido linoléico e o ácido linolênico (PEYREFITTE *et al.*, 1998)

São empregados em farmácias na forma natural ou na de emulsão, por suas propriedades emolientes, podendo também servir de veículo para outros medicamentos e alguns apresentando propriedades terapêuticas especiais (ROBBERS *et al.*, 1997).

Os óleos vegetais têm se destacado como constituinte da fase oleosa de emulsões cosméticas, devido às propriedades como baixa viscosidade e massa molecular, o que os tornam menos oclusivos que os óleos minerais; com boa penetração na pele e capacidade de transporte de agentes terapêuticos, compatibilidade com a pele e possibilidade de fornecer nutrientes como ácidos graxos essenciais (SILVA & SOARES, 1996).

A tendência ao consumo de produtos naturais e a elevação do preço dos produtos petroquímicos colaboram ainda, no momento, para o desenvolvimento dos estudos sobre aplicação dos óleos vegetais (SILVA & SOARES, 1996). Os óleos mais polares, como os vegetais, podem ser adicionados a produtos cosméticos supondo-se que sejam menos oclusivos, permitindo certa permeação da água na barreira da fase oleosa (CHANDLER, 2002).

Óleo de Urucum

Segundo CTFA (1988) **Annatto**. Substância corante extraída das sementes da *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Também chamado de *annatto oil*, contém bixin e vários pigmentos de cor amarela a laranja, que dão reações para carotenos. Solúvel em éter, álcool e óleos e insolúvel em água (THE MERCK INDEX, 2001). De acordo com Beraca *Bixa orellana seed oil*, líquido viscoso a 25°C e com odor característico. Obtido da maceração e posterior percolação da *Bixa orellana* L., atua como adjuvante dos filtros solares devido à presença de carotenóides (pigmentos naturais), promove ação calmante tópica e emoliência. O alto teor de

ácidos graxos insaturados promove absorção cutânea rápida e completa. Os ácidos graxos insaturados não impedem a oxigenação e secreção natural da pele, condições estas que evitam a dilatação dos poros, a formação de cravos e o acúmulo de gorduras. A concentração recomendada para uso em produtos cosméticos é a partir de 2,0% (BERACA).

Óleo de Café

Segundo The Merck Index (2001) *Coffee oil, Coffea bean oil*. Óleo do grão do café. Óleo graxo encontrado em grãos de café num grau de 15% (base seca). De acordo com o catálogo da Chemyunion, *melscreen[®] coffee* é um extrato do óleo da semente de café verde (Arábica), com nome científico *Coffea arabica, coffea arabica (Coffee) seed oil*. Derivado das sementes das espécies de arbustos pertencentes à família *Rubiceae*, gênero *Coffea*. Extraído por prensagem a frio, é rico em ácidos graxos, apresenta teor bastante interessante em ácido linoléico (aproximadamente 40%), que é ácido graxo essencial. As sementes de café contêm de 1 a 2 % de cafeína, cerca de 0,25% de trigonelina (N-metilbetaína do ácido nicotínico), de 3 a 5 % de tanino, cerca de 15% de glicose e dextrina, de 10 a 13% de óleos gordurosos e de 10 a 13% de proteínas. Testes positivos para ácidos linoléico (25,66%) e oléico (12,36%) são obtidos. Óleo marrom-esverdeado, com odor característico de grãos de café verde, ácidos saturados 33,60%, ácidos graxos insaturados 38,02% (THE MERCK INDEX, 2001). Apresenta atividades antioxidantes e anti-radicais livres (PHARMASPECIAL, 1998), capacidade de bloquear a radiação solar principalmente na faixa de 280-320 nm (radiação UVB), que está relacionado com o seu conteúdo de materiais insaponificáveis (aproximadamente 10%) presentes nesse óleo, além de lubrificar a pele e regenerar a barreira hidrolipídica. A concentração recomendada é de 1,0 a 5,0% (CHEMYUNION).

Óleo de Melaleuca

Segundo CTFA (1988) *tea tree oil*, óleo medicinal nativo da Austrália obtido pela destilação a partir das folhas e ramos terminais da árvore, *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae*). Também encontrado no The Merck Index (2001) como *melaleuca oil*, *tea tree oil* (*Melaleuca alternifolia*). Mistura complexa de hidrocarbonetos e terpenos de aproximadamente 100 componentes. Os dois componentes padronizados para uso comercial são 1,6-cineol (máximo de 15%) e o 1-terpinen-4-ol (mínimo de 30%). Contem cerca de 50 a 60% de terpenos, cineol (até 10%) e terpinol. Líquido volátil incolor a amarelo pálido, límpido, com odor fresco característico de terpeno (MARTINDALE, 1996; THE MERCK INDEX, 2001). Usado como agente anti-séptico e flavorizante em produtos de higiene pessoal. Solúvel em 80% de álcool (p/p): 0,6 a 0,8 volumes (THE MERCK INDEX, 2001).

De acordo com Beraca tem ação anti-séptica contra diversos microrganismos. Atividade antiinflamatória, antibacteriana, fungistática, conservante (PHARMASPECIAL, 1998).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

A presente pesquisa teve como objetivo desenvolver e avaliar a estabilidade de uma emulsão cosmética O/A, com fase interna constituída por óleos vegetais (óleo de urucum, óleo de café e óleo de melaleuca) contendo ou não cafeína, como agente ativo indicado para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite), bem como a análise do perfil de liberação *in vitro* da cafeína.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e obtenção da emulsão O/A, contendo ou não cafeína;
- Avaliação de isotropia ou anisotropia e identificação de cristais líquidos;
- Avaliação da estabilidade físico-química da emulsão O/A;
- Estudo do perfil de liberação da cafeína *in vitro*.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Fase oleosa

Óleos vegetais:

- Óleo de Urucum: *Annatto oil* (CTFA, 1988).
- Óleo de Café (Melscreen[®] Coffee): *coffee oil*, *Coffea bean oil* (THE MERCK INDEX, 2001).
- Óleo de Melaleuca: *tea tree oil*, *melaleuca oil*, *tea tree oil* (*Melaleuca alternifolia*) (CTFA, 1988; THE MERCK INDEX, 2001).

Emoliente:

- Palmitato de isopropila: *isopropyl palmitate* (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996).

Tensoativos:

- Álcool oleílico 3 OE - (Volpo[®] 03): *Oleth 3*. Valor de EHL é 6,6 (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996; CRODA; CTFA, 1988).
- Álcool oleílico 20 OE - (Volpo[®] 20): *Oleth 20*. Valor de EHL é 15,3 (CRODA; CTFA, 1988).
- Álcool cetoestearílico 5 OE - (Unitol[®] CE 50): *Ceteareth 5*. Valor de EHL é 9,2 (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996 ; CTFA, 1988; OXITENO, 2004).
- Álcool estearílico 2 OE - (Unitol[®] E 20): *Steareth 2*. Valor de EHL é 4,7 (BERACA; COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996; CTFA, 1988; OXITENO, 2004).

- Álcool cetosteárfílico: *Cetostearyl alcohol* (CTFA, 1988; ELY MARTINS).
- Oleato de glicerila PEG-20 (Tagat[®] O2): *PEG-20 glyceryl oleate* (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996).
- Poloxamer 331 (Symperonic[®] 101): *Poloxamer 331* (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996).

4.1.2. Fase aquosa

- Água recém destilada
- Benzoato de sódio: *sodium benzoate* (THE MERCK INDEX, 2001; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975).
- Propilenoglicol: *propylene glycol* (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996), 1,2-propanodiol, metil etileno glicol (THE MERCK INDEX, 2001).
- Glicerina: *glycerin* (COSMETIC BENCH REFERENCE, 1996), 1,2,3-propanotriol, glycerol (THE MERCK INDEX, 2001).
- Ativo: Cafeína: *Caffeine; anhydrous caffeine; 1,3,7-trimethylxanthine* (THE MERCK INDEX, 2001; MARTINDALE, 1996; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975).

4.1.3. Solução Tampão

- Acetato de sódio 0,1M pH 5,5: 6,804 g de acetato de sódio/ 500 ml de água destilada – acerto de pH com solução de ácido acético 2,0%.
- Borato pH 10,0: 59 ml de solução A (12,404 g ácido bórico + 100 ml solução hidróxido de sódio 1N/ 1,0 L água destilada) + 41 ml de solução hidróxido de sódio 0,1N.

4.1.4. Equipamentos

- Agitador mecânico Fisaton – Mod.713D;
- Agitador magnético múltiplo Cole Parmer Instrument Co e Variomag Multipoint;
- Banho-maria ultratermostático Nova Técnica Ltda – Mod. 281 NT;
- Bomba peristáltica – Pump pro Watson Marlow;
- Célula de Franz modificada;
- Centrífuga Excelsa Baby II – 440Watts, Fanem – Mod. 206R;
- Coletor Pharma test;
- Condutivímetro Digimed – Mod. DM-31;
- Densímetro DMA 4500;
- Eletroforese capilar, Beckman Coulter model P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System – Fullerton, USA;
- Espectrofotômetro U-2001 Hitachi™ e Specord M500 Zeiss Alemanha;
- Estufa de Cultura Fanem – Mod. 002 CB;
- Microscópio de Luz Polarizante Olympus – Mod. BX 50;
- Peagômetro Digimed Mod. DM 20;
- Reômetro Brookfield Mod. LVDV III.

4.2. Métodos

4.2.1. Desenvolvimento das emulsões O/A

4.2.1.1. Preparo das emulsões

A emulsão foi preparada pelo método de inversão de fases: as fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à temperatura de $75 \pm 5^\circ\text{C}$. Em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa sob agitação constante de 600 rpm, com o auxílio de um agitador mecânico (Fisaton – Mod.713D), e contínua até que a emulsão atingisse a temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (AZZINI, 1999).

4.2.1.2. Determinação do valor do EHL requerido (Sistema EHL)

Neste estudo, o Sistema EHL foi empregado para determinar o valor do EHL requerido da fase oleosa. O cálculo da razão de cada tensoativo na mistura foi realizado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{EHL}_{\text{req}} = \frac{(\text{EHL}_A \times \%A) + (\text{EHL}_B \times \%B)}{100}$$

onde, A = tensoativo lipofílico;

B = tensoativo hidrofílico;

EHL_{req} = valor de EHL requerido do óleo (SANTOS *et al.*, 2005).

A determinação do valor de EHL requerido foi realizada tanto para emulsões contendo apenas óleo de urucum como fase oleosa (**Tabela 1**) quanto para aquelas contendo os três óleos: urucum, café e melaleuca (**Tabela 2**).

Para esta determinação foi utilizado como tensoativo lipofílico *Oleth 3*, que apresenta valor de EHL 6,6 e como tensoativo hidrofílico *Oleth 20*, com valor de EHL 15,3.

Tabela 1 – Composição das formulações com óleo de urucum desenvolvidas em função da determinação do valor do EHL.

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)			
	A1	A2	A3	A4
Óleo de urucum	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>Oleth 3</i> + <i>Oleth 20</i>	5,0	10,0	12,0	15,0
Água destilada <i>qsp</i>	100,0	100,0	100,0	100,0
Faixa de valor de EHL testada	*	*	*	**

(*) 7,0- 8,0- 9,0- 10,0- 11,0- 12,0- 13,0- 14,0- 15,0

(**) 8,2- 8,4- 8,6- 8,8- 9,0- 9,2

Tabela 2 – Composição das formulações com óleo de urucum, café e melaleuca como fase oleosa desenvolvidas em função da determinação do valor do EHL.

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)								
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
Fase oleosa	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>Oleth 3</i> + <i>Oleth 20</i>	5,0	10,0	15,0	10,0	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0
Água destilada <i>qsp</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Valores de EHL testados	*	**	**	***	***	***	***	***	***

(*) 7,4- 8,0- 8,6- 8,8- 9,0- 9,2- 9,4

(**) 7,0- 7,4- 7,8- 8,2- 8,6- 9,0- 9,2- 9,4- 9,8- 10,2

(***) 9,0- 9,2

4.2.1.3. Obtenção de fase líquida cristalina e estudo do perfil reológico

Visando a obtenção de fases líquidas cristalinas, foram desenvolvidas outras formulações contendo como fase oleosa óleo de urucum (A5, A6, A7 e A8- valor de EHL requerido 9,2) (**Tabela 3**) ou sistema de óleos: óleos de urucum, café e melaleuca (B10 e B11- valor de EHL requerido 9,0) (**Tabela 4**). Essas formulações foram produzidas utilizando tensoativos nas concentrações de 10,0 e 15,0%.

Tabela 3 – Composição das formulações desenvolvidas com óleo de urucum e *Cetereath 5*, em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)			
	A5	A6	A7	A8
Óleo de urucum	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>Cetereath 5</i>	10,0	15,0	10,0	15,0
Álcool cetoestearílico	-	-	1,0	1,0
Água destilada <i>qsp</i>	100,0	100,0	100,0	100,0
Valor de EHL	9,2	9,2	9,2	9,2

Tabela 4 – Composição das formulações com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Steareth 2*, desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)	
	B10	B11
Óleo de urucum	8	8
Óleo de café	1	1
Óleo de melaleuca	1	1
<i>Cetereath 5</i> + <i>Steareth 2</i>	10,0	15,0
Água destilada <i>qsp</i>	100,0	100,0

4.2.1.4. Diagrama de fase (diagrama ternário– óleo / tensoativo / água)

Neste estudo limitou-se uma determinada região do diagrama ternário (B10: 10% de óleo, 10% de mistura de tensoativos e 80% de água) (**Figura 6**), cujas emulsões foram selecionadas com o objetivo de avaliar aspectos microscópicos e a presença de fases mesomórficas. Estas emulsões, que estão descritas na **Tabela 5**, continham como fase oleosa os óleos de urucum, café e melaleuca, mantendo a proporção de 8: 1: 1 respectivamente; como fase aquosa apenas água recém destilada e como agente emulsificante uma mistura de tensoativos (*Steareth 2* e *Ceteareth 5*) mantendo o valor de EHL requerido da fase oleosa igual a 9,0.

Figura 6 – Diagrama ternário óleo-tensoativo-água. Região destacada representa as emulsões selecionadas para o estudo.

Tabela 5 – Composição das formulações selecionadas do diagrama de fase.

	Formulação (%) (p/p)							
	B10	C1	B11	C3	C4	C5	C6	C7
Fase oleosa	10	15	10	5	5	10	15	20
Tensoativos	10	10	15	15	10	5	5	10
Água destilada <i>q.s.p.</i>	80	75	75	80	85	85	80	70

4.2.1.5. Determinação da velocidade de agitação no preparo das emulsões

As emulsões foram preparadas conforme já descrito no item 4.2.1.1, porém variou-se a velocidade de agitação de 300 a 1500 rpm com intervalo de 300 entre cada uma delas.

Composição (formulação B10):

Óleo de urucum	8,0% (p/p)
Óleo de café	1,0% (p/p)
Óleo de melaleuca	1,0% (p/p)
<i>Ceteareth 5 + Steareth 2</i>	10,0% (p/p)
Água destilada <i>qsp</i>	100,0% (p/p)

As formulações denominadas de B10a, B10b, B10c, B10d e B10e foram preparadas com velocidade de agitação de 300, 600, 900, 1200 e 1500 rpm, respectivamente.

4.2.1.6. Incorporação da cafeína

4.2.1.6.1. Seleção da formulação

As emulsões (**Tabela 6**), contendo como fase oleosa os óleos de urucum, café e melaleuca, mantendo a proporção de 8: 1: 1 respectivamente, foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.1, sendo a cafeína incorporada na fase aquosa.

Tabela 6 – Composição das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção da formulação.

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Fase oleosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Ceteareth 5 + Steareth 2</i>	10	10	10	10	10	15	10	15	10	15
Cafeína	2	1,5	2	2	1	1	1	1	1	1
Propilenoglicol	-	-	5	-	-	-	5	5	10	10
Glicerina	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
Benzoato de Sódio	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Água destilada <i>q.s.p.</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

4.2.1.6.2. Seleção do processo de incorporação

As emulsões continham como fase oleosa os óleos de urucum, café e melaleuca, mantendo a proporção de 8: 1: 1 respectivamente; 15,0% de mistura de tensoativos (*Steareth 2* e *Ceteareth 5*), mantendo o valor de EHL requerido da fase oleosa igual a 9,0; e como fase aquosa água recém destilada e ativo (cafeína + benzoato de sódio) (formulação D6– **Tabela 6**).

Estas emulsões foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.1, porém variou-se o processo de incorporação do ativo. A cafeína foi previamente solubilizada com auxílio de benzoato de sódio 1:1 em parte da água. Esta solução foi adicionada à formulação pelos seguintes processos:

- Na fase aquosa, durante a manipulação da emulsão.
- Durante a emulsificação, após verter fase aquosa.

- c) Após resfriamento da emulsão, com agitação constante (600rpm) e contínua por 5 minutos.
- d) Vinte e quatro horas após a manipulação da emulsão, com agitação constante (600rpm) e contínua por 5 minutos.

Assim, essas emulsões foram denominadas de D6a, D6b, D6c e D6d, respectivamente.

4.2.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A

4.2.2.1. Testes de Estabilidade Preliminares (TEP)

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis após vinte e quatro horas de sua manipulação foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998).

4.2.2.1.1. Análise macroscópica

Teve como objetivo verificar características organolépticas e a homogeneidade das formulações com a finalidade de identificar a instabilidade visível (presença de sedimentação, coalescência, alterações de cor). As emulsões classificadas como estáveis macroscopicamente foram submetidas aos demais testes (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998).

4.2.2.1.2. Teste de centrifugação

Aproximadamente cinco gramas (5,0 g) de cada amostra das emulsões foram pesados e submetidos, na centrífuga (Fanem, mod. 206R) aos ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm (70, 440 e 863 g) durante 15 minutos em cada rotação, e em temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998; IDSON, 1993a, 1993b; RIEGER, 1996).

4.2.2.1.3. Análise microscópica

Pequena quantidade das amostras foram colocadas em lâmina de vidro e submetidas à análise microscópica (Microscópio Olympus, mod. BX 50) visando observar características da formulação, como glóbulos e homogeneidade da emulsão, e com auxílio de polarização, observar a presença de áreas de isotropia (campo totalmente escuro) ou anisotropia (cristais líquidos com birrefringência) e identificar, se possível, as fases mesomórficas presentes nas formulações (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998).

4.2.2.1.4. Estresse térmico

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos transparentes de poliestireno fechados e submetidas ao aquecimento em banho ultratermostático (Nova Técnica Ltda, mod. 281 NT) na faixa de temperatura de 40 ± 2 a $80 \pm 2^\circ\text{C}$. O aumento da temperatura foi programado de 5 em 5°C , mantendo-se por trinta minutos em cada temperatura (BRACONI *et al.*, 1995). Estas foram avaliadas macroscopicamente a cada aumento da temperatura e ao término de 80°C .

Para os testes de centrifugação, estresse térmico e análise macroscópica, empregou-se a seguinte nomenclatura para qualificá-los: **N** = Normal, sem alteração; **LM** = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); **M** = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total) (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

4.2.2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA)

Cinquenta gramas (50,0 g) das emulsões consideradas estáveis pelos testes preliminares de estabilidade foram pesados e acondicionados em frascos fechados e submetidos a condições variáveis de temperatura e tempo (IDSON, 1993a; IDSON, 1993b; RIEGER, 1996).

- ✓ Temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- ✓ Geladeira ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- ✓ Estufa a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Estufa de Cultura Fanem, mod. 002 CB).

As formulações foram submetidas às temperaturas acima citadas por um período de trinta dias e as análises foram realizadas no 1º, 7º, 15º e 30º dias. O 1º dia do teste, nesta metodologia, corresponde a vinte e quatro horas após o preparo das formulações.

- ✓ Ciclo gela-degela – as amostras foram submetidas alternadamente às temperaturas de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (geladeira) por 24 horas e $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (estufa) por mais 24 horas, completando assim um ciclo. As leituras dos parâmetros de estabilidade foram realizadas antes do início do teste (24 horas após o preparo) e ao final do 6º ciclo consecutivo (12º dia).

As amostras foram avaliadas macroscopicamente a cada mudança de temperatura durante a realização do teste (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998).

4.2.2.3. Determinação dos valores de pH

Após vinte e quatro horas da manipulação foram preparadas diluições 1:10, pesando-se um grama (1,0 g) da emulsão teste e nove gramas (9,0 g) de água recém destilada, e com auxílio de agitação magnética (agitador magnético múltiplo Cole Parmer Instrument Co), a amostra foi homogeneizada. O valor de pH foi determinado, à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra (Peagômetro Digimed Mod. DM 20), (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998). Este teste foi realizado em duplicata com três leituras de cada.

4.2.2.4. Determinação da condutividade elétrica

Após vinte e quatro horas da manipulação, utilizando-se condutivímetro (Digimed, Mod. DM-31) aferido com solução padrão de KCl 0,1N, determinou-se a condutividade elétrica das emulsões, à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998). Este teste foi realizado em duplicata.

4.2.2.5. Determinação da densidade

Com o objetivo de determinar e padronizar a densidade da emulsão estável, após vinte e quatro horas da manipulação, submeteu-se pequena quantidade da amostra, utilizando-se uma seringa de cinco mililitros (5 ml), no densímetro (DMA 4500), o qual fornece a densidade e gravidade específica (DMA 4500/5000[®], 2000), com correção de temperatura para $20,00^{\circ}\text{C}$. Foram realizadas três leituras de cada amostra.

4.2.2.6. Comportamento Reológico

O estudo do perfil reológico e viscosidade da emulsão foi realizado utilizando-se reômetro do tipo cilindro coaxial (Brookfield Mod. LVDV III), operando o *Software Rheocalc*. Todas as análises foram realizadas utilizando-se *spindle* SC4-25 e à temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). As determinações foram realizadas com velocidades de rotação progressivamente mais altas e subsequentemente diminuídas visando à obtenção das curvas ascendente e descendente, respectivamente. As velocidades de rotação foram determinadas de acordo com a capacidade de leitura do aparelho e consistência da emulsão (MORAIS *et al.*, 2003).

Com valores de viscosidade aparente obtidos, através do *Software Rheocalc*, foram determinados os valores do índice de fluxo e de consistência de acordo com a Lei de Ostwald ou Lei das Potências (ALMEIDA & BAHIA, 2003; GAO *et al.*, 2003):

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^\eta$$

onde, τ = tensão de cisalhamento (*Shear stress*) (dina/cm^2);

K = índice de consistência (cP);

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (*Shear rate*) (1/seg);

η = índice de fluxo.

4.2.3. Avaliação da liberação da cafeína *in vitro*

4.2.3.1. Construção da Curva de Calibração em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 – Espectrofotometria

Anteriormente à construção da curva de calibração da cafeína, foi efetuada a varredura do espectro de absorção para verificar a região de comprimento de onda que resulta em maior absorbância da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5, sendo que a 273 nm a solução apresentou absorbância máxima. A varredura foi realizada utilizando-se espectrofotômetro U-2001 Hitachi TM, comprimento de onda da luz ultravioleta (UV, 200– 380 nm) e solução tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 utilizada como branco.

A curva de calibração da cafeína foi construída a partir de soluções diluídas em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 nas concentrações de 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 µg/ml e solução tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 utilizado como branco. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 273 nm. Essas análises foram realizadas utilizando espectrofotômetro U-2001 Hitachi TM.

4.2.3.2. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5

A solução para análise foi preparada adicionando-se excesso de cafeína (30,0 mg/ml) em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 e mantida em agitação magnética (agitador magnético múltiplo Cole Parmer Instrument Co), à temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante a noite 19 horas. Após esse período procedeu-se a separação da cafeína não solubilizada. A solução foi filtrada (papel de filtro) e, em seguida, centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram analisadas espectrofotometricamente

(espectrofotômetro U-2001 Hitachi TM) no comprimento de onda de 273 nm e a quantidade de ativo solubilizada foi determinada (CHORILLI, 2004; CLÉMENT *et al.*, 2000).

4.2.3.3. Avaliação da liberação da cafeína – Diálise

A avaliação da liberação do ativo foi realizada utilizando-se de um frasco de diálise (célula de Franz modificada) onde a formulação teste foi acondicionada no frasco superior–doador (área de exposição para liberação de 0,8 cm²) e a solução receptora no inferior (6 ml), sendo separados por uma membrana de celulose (21 mm de diâmetro, Servapor[®] - Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG). As membranas de celulose foram cortadas na forma retangular de 6x8 cm e submetidas à hidratação mantendo-as em béquer cobertas com água destilada por vinte e quatro horas. Essa membrana de celulose, previamente hidratada, foi acoplada na abertura do frasco doador. A solução tamponada foi colocada no frasco inferior (receptor) até a membrana, mantendo-se em contato com esta. O meio receptor foi agitado continuamente com agitador magnético (Variomag Multipoint) mantendo a homogeneidade do meio (OMOTOSHO *et al.*, 1989). O fluxo de circulação da solução receptora (0,84) foi regulado por bomba peristáltica (Pump pro Watson Marlow).

Para garantir a “*sink condition*” a solubilidade do ativo na solução receptora tamponada foi previamente comprovada e, foi utilizado 1 g da amostra evitando assim que o sistema entrasse em equilíbrio, pois durante a diálise a concentração na solução não deve exceder 10% da solubilidade desse ativo. O frasco doador foi mantido fechado, ficando a amostra sob oclusão, para evitar evaporação e mudanças na composição, minimizando interferentes do ambiente (CHIEN, 1992).

A diálise foi realizada em duplicata à temperatura controlada (37± 1°C), durante 12 horas. Alíquotas de 1,0 ml foram retiradas em função do tempo (intervalo de 1 hora) através

de coletor (Pharma test) e o volume retirado substituído por solução receptora, mantendo com isto os frascos nas mesmas condições de trabalho (CHIEN, 1992). As alíquotas foram analisadas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 273 nm. A quantidade de ativo foi calculada através da equação da reta obtida pela curva de calibração construída por espectrofotometria e com correção de diluição. Esse valor obtido foi então dividido pela área de exposição para liberação, com o objetivo de se ter a quantidade liberada por cm^2 . O perfil de liberação da emulsão foi obtido construindo-se gráfico da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) (CHORILLI, 2004; RANGEL, 1998).

A solução receptora utilizada foi tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5. Essa análise foi realizada em duplicata para as seguintes amostras:

- formulação B11c (B11 + 1% cafeína);
- formulação D6d (B11 + 1% cafeína + 1% BNa)

4.2.3.4. Comparação da metodologia de análise da cafeína – Eletroforese Capilar (CE)

4.2.3.4.1. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Espectrofotometria

Anteriormente à construção da curva de calibração da cafeína, foi efetuada a varredura do espectro de absorção para verificar a região de comprimento de onda que resulta em maior absorbância da cafeína em tampão borato pH 10,0, sendo que a 273 nm a solução apresentou absorbância máxima. A análise foi realizada utilizando-se espectrofotômetro Specord M500 Zeiss Alemanha, comprimento de onda da luz ultravioleta (UV, 200– 380 nm) e solução tampão borato pH 10,0 como branco.

A curva de calibração da cafeína foi construída a partir de soluções diluídas em tampão borato pH 10,0 nas concentrações de 0,5- 2,0- 5,0- 10,0- 25,0 e 50,0 µg/ml e solução tampão borato pH 10,0 utilizado como branco. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 273 nm. Essas análises foram realizadas utilizando espectrofotômetro Specord M500 Zeiss Alemanha e os dados foram plotados.

4.2.3.4.2. Solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0

A análise foi realizada para solução saturada de cafeína (30,0 mg/ml) em tampão borato pH 10,0. A solução foi mantida em agitação magnética, à temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante a noite (19 horas). Após esse período procedeu-se a separação da cafeína não solubilizada. A solução foi filtrada (papel de filtro) e, em seguida, centrifugada (Centrífuga MLW T 62.1). O sobrenadante foi novamente filtrado utilizando seringa e filtro de nylon 0,45 µm. Alíquotas de 1,0 ml foram diluídas em 100 ml de solução tampão borato pH 10,0 e foram analisadas espectrofotometricamente (espectrofotômetro Specord M500 Zeiss Alemanha) no comprimento de onda de 273 nm, determinando assim a quantidade de ativo solubilizada (CHORILLI, 2004).

4.2.3.4.3. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Eletroforese Capilar (CE)

O experimento de Eletroforese Capilar (CE) foi realizado usando Beckman Coulter model P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System (Fullerton, USA) com detector UV na faixa de 190-600 nm, equipado com software 32 Karat versão 5.0 (Fullerton, USA) para controle do instrumento e análise dos dados. O capilar, obtido do Chromatographie Service

GmBH (Langerwehe, Germany), tem como características comprimento total 55,0 cm, comprimento até detector 44,5 cm e diâmetro 50 μm . O condicionamento foi realizado de acordo com os seguintes passos: (a) inicialmente o capilar foi lavado por 5 min com NaOH, 5 min com água destilada e 5 min com solução tampão (borato pH 10,0). (b) entre as leituras (amostras): 4 min com NaOH, 2 min com água destilada, 4 min com solução tampão (borato pH 10,0). A injeção da amostra foi a 0,5 psi, 5 segundos, a voltagem foi 30 KV e tempo de corrida foi 20 min. O comprimento de onda utilizado para detecção foi 200nm. A construção da curva de calibração foi feita para cafeína e benzoato de sódio em solução tampão borato pH 10,0 nas concentrações de 20,0- 40,0- 60,0- 80,0 e 100,0 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.4.4. Avaliação da liberação da cafeína – Sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”)

A avaliação da liberação da cafeína foi realizada com outra formulação contendo ou não como ativo solução de cafeína + benzoato de sódio (1:1), que se encontra descrita na **Tabela 7**. O método utilizado foi o sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”), que consistiu de 9 células de poliacrilato fixadas juntamente (**Figura 7**) contendo 3 membranas de colódio em cada uma. A área de exposição para liberação foi de 4,0 cm^2 . Esse aparato foi colocado em câmara com temperatura controlada de $32 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante o período experimental, que foi 60 minutos. Ao final desse tempo as membranas foram colocadas separadamente em tubos contendo 2,0 ml de solução receptora (tampão borato pH 10,0) e mantidas por 15 minutos em ultrassom (NEUBERT *et al.*, 1991). Posteriormente foram filtradas através de seringa e filtro de nylon 0,45 μm . A solução resultante foi analisada por eletroforese capilar (CE) e a quantidade de ativo calculada através da equação da reta obtida pela curva de calibração construída por eletroforese capilar e com correção de diluição.

Esse valor obtido foi então dividido pela área de exposição para liberação, com o objetivo de se ter a quantidade liberada por cm^2 .

A quantidade de amostra aplicada em cada célula foi 10- 15 mg. As células foram tratadas da seguinte maneira:

- Células 1 a 5: o excesso da formulação na membrana 1 (mais superficial) foi removido após tempo experimental;
- Células 6 a 8: o excesso da formulação na membrana 1 (mais superficial) não foi removido após tempo experimental;
- Célula 9: branco – formulação aplicada não continha ativo (caféina + benzoato de sódio).

Essa análise apresentou ainda um *grupo controle*: a mesma quantidade de formulação contendo ativo foi diretamente pesada em tubo contendo 2,0 ml de solução receptora, mantida por 15 minutos em ultrassom e filtrada através de seringa e filtro de nylon 0,45 μm .

Figura 7 – Fotografia do aparato contendo 9 células utilizado no sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”).

Tabela 7 – Composição da formulação com ativo (caféina + benzoato de sódio) desenvolvida para avaliação da liberação da caféina através do sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”).

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)
	F1
Oleato de glicerila PEG-20	8,0
Poloxamer 331	12,0
Palmitato de isopropila	5,0
Caféina	1,0
Benzoato de sódio	1,0
Propilenoglicol	25,0
Água destilada q.s.p.	100,0

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento das emulsões O/A

5.1.1. Determinação do valor do EHL requerido (Sistema EHL)

5.1.1.1. Fase oleosa contendo apenas óleo de urucum (valor do EHL requerido do óleo de urucum)

Para obter os valores de EHL exigidos por emulsões O/A (7,0 a 15,0) utilizou-se misturas de tensoativos previamente citados, alternando-os em pares, cujas quantidades encontram-se descritas na **Tabela 8**, bem como os respectivos EHL resultantes.

Tabela 8 – Quantidades de tensoativos de acordo com o valor de EHL.

Valor de EHL ↓	Mistura de tensoativos (%) (p/p)							
	5,0		10,0		12,0		15,0	
	O3	O20	O3	O20	O3	O20	O3	O20
7,0	4,77	0,23	9,54	0,46	11,45	0,55	-	-
8,0	4,20	0,80	8,39	1,61	10,07	1,93	-	-
8,2	-	-	-	-	-	-	12,24	2,76
8,4	-	-	-	-	-	-	11,90	3,10
8,6	-	-	-	-	-	-	11,55	3,45
8,8	-	-	-	-	-	-	11,21	3,79
9,0	3,62	1,38	7,24	2,76	8,69	3,31	10,86	4,14
9,2	-	-	-	-	-	-	10,52	4,48
10,0	3,05	1,95	6,09	3,91	7,31	4,69	-	-
11,0	2,47	2,53	4,94	5,06	5,93	6,07	-	-
12,0	1,90	3,10	3,79	6,21	4,55	7,45	-	-
13,0	1,32	3,68	2,64	7,36	3,17	8,83	-	-
14,0	0,75	4,25	1,49	8,51	1,79	10,21	-	-
15,0	0,17	4,83	0,34	9,66	0,41	11,59	-	-

onde, O3 = Oleth 3, com valor de EHL 6,6; O20 = Oleth 20, valor de EHL 15,3 e - = não testada.

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações desenvolvidas com a finalidade de determinar o valor de EHL requerido para o óleo de urucum, formulações A1, A2, A3 e A4 (5,0%; 10,0%; 12,0% e 15,0% de mistura de tensoativos, respectivamente) descritas na **Tabela 1**, encontram-se na **Tabela 9**.

Segundo análise macroscópica e teste de centrifugação a formulação que apresentou estabilidade foi a A4 (15,0% de sistema tensoativo) na proporção que obteve valor de EHL 9,2.

Tabela 9 – Resultados da análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL requerido.

Valores de EHL ↓	Análise macroscópica				Centrifugação			
	Formulação				Formulação			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
7,0	M	N	M	-	-	M	-	-
8,0	M	N	N	-	-	M	M	-
8,2	-	-	-	N	-	-	-	M
8,4	-	-	-	N	-	-	-	LM
8,6	-	-	-	N	-	-	-	LM
8,8	-	-	-	N	-	-	-	LM
9,0	M	M	N	N	-	-	LM	LM
9,2	-	-	-	N	-	-	-	N
10,0	M	M	M	-	-	-	-	-
11,0	M	M	M	-	-	-	-	-
12,0	M	M	M	-	-	-	-	-
13,0	M	M	M	-	-	-	-	-
14,0	M	M	M	-	-	-	-	-
15,0	M	M	M	-	-	-	-	-

(A1, A2, A3 e A4 contendo 5,0%; 10,0%; 12,0% e 15,0% de mistura de tensoativos, respectivamente) onde, M= Modificada (separação de fases); N= Normal (estável); LM= Levemente Modificada (separação parcial); - = não testada.

5.1.1.2. Fase oleosa contendo óleo de urucum, de café e de melaleuca (valor do EHL requerido do sistema de óleos)

As quantidades de cada tensoativo foram calculadas para obter os valores de EHL exigidos das emulsões O/A descritas na **Tabela 10**, bem como os respectivos valores de EHL.

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações desenvolvidas neste teste (**Tabela 2**) encontram-se na **Tabela 11**. Apenas as formulações com valor de EHL 9,0 contendo 14,0 e 15,0% de tensoativos (formulações B8 e B9) mostraram-se estáveis.

Tabela 10 – Quantidades de tensoativos de acordo com o valor de EHL.

Valor de EHL ↓	Mistura de tensoativos (%) (p/p)													
	5,0		10,0		11,0		12,0		13,0		14,0		15,0	
	O3	O20	O3	O20	O3	O20	O3	O20	O3	O20	O3	O20	O3	O20
7,0	-	-	9,54	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	14,31	0,69
7,4	4,54	0,46	9,08	0,92	-	-	-	-	-	-	-	-	13,62	1,38
7,8	-	-	8,62	1,38	-	-	-	-	-	-	-	-	12,93	2,07
8,0	4,20	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,2	-	-	8,16	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-	12,24	2,76
8,6	3,85	1,15	7,70	2,30	-	-	-	-	-	-	-	-	11,55	3,45
8,8	3,74	1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9,0	3,62	1,38	7,24	2,76	7,97	3,03	8,69	3,31	9,41	3,59	10,14	3,86	10,86	4,14
9,2	3,51	1,49	7,01	2,99	7,71	3,29	8,41	3,59	9,11	3,89	9,82	4,18	10,52	4,48
9,4	3,39	1,61	6,78	3,22	-	-	-	-	-	-	-	-	10,17	4,83
9,8	-	-	6,32	3,68	-	-	-	-	-	-	-	-	9,48	5,52
10,2	-	-	5,86	4,14	-	-	-	-	-	-	-	-	8,79	6,21

onde, O3 = Oleth 3, com valor de EHL 6,6; O20 = Oleth 20, valor de EHL 15,3 e - = não testada.

Tabela 11 – Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com óleo de urucum, café e melaleuca desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL requerido.

Valor de EHL ↓	Análise macroscópica									Centrifugação								
	Formulação									Formulação								
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
7,0	-	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,4	M	N	N	-	-	-	-	-	-	-	M	M	-	-	-	-	-	-
7,8	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	M	M	-	-	-	-	-	-
8,0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,2	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	M	M	-	-	-	-	-	-
8,6	M	N	N	-	-	-	-	-	-	-	M	M	-	-	-	-	-	-
8,8	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9,0	M	N	N	M	M	M	N	N	N	-	M	N	-	-	-	M	N	N
9,2	M	N	N	M	M	M	M	N	N	-	M	N	-	-	-	-	M	M
9,4	M	N	M	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-
9,8	-	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,2	-	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 e B9 contendo 5,0%; 10,0%; 15,0%; 10,0%; 11,0%; 12,0%; 13,0%; 14,0% e 15,0% de mistura de tensoativos, respectivamente)

onde, M = Modificada (separação de fases); N = Normal (estável); - = não testada.

5.1.2. Obtenção de fase líquida cristalina e estudo do perfil reológico

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações A5, A6, A7 e A8, descritas na **Tabela 3**, são apresentados na **Tabela 12**. Todas essas formulações permaneceram estáveis. A análise microscópica é mostrada na **Figura 8** e revela a presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar em todas as formulações.

A análise reológica foi realizada com velocidade de rotação aumentando até 240 rpm e diminuindo até repouso total com intervalo de 40 rpm, exceto para a amostra A8, cujo processo foi o mesmo, mas a velocidade de rotação foi até 100 rpm e retornando ao repouso com intervalo de 20 rpm, devido à capacidade de leitura do equipamento e consistência da emulsão. A rotação foi mantida por 20 segundos em todas as amostras. Os valores de índice de fluxo e de consistência, bem como reogramas obtidos na análise reológica estão mostrados na **Tabela 13** e nas **Figuras 9 e 10**. Todas essas formulações apresentam comportamento pseudoplástico e a presença de tixotropia.

Tabela 12 – Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões desenvolvidas com óleo de urucum e *Cetereath 5*, em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Formulação	Análise macroscópica	Centrifugação
A5	N	N
A6	N	N
A7	N	N
A8	N	N

(A5, A6, A7 e A8 contendo 10,0% de tensoativo; 15,0% de tensoativo; 10,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárfílico e 15,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárfílico, respectivamente). Onde, N = Normal (estável).

Figura 8 – Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões preparadas com óleo de urucum e *Ceteareth-5*, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão A5 (10,0% de tensoativo); (b) emulsão A6 (15,0% de tensoativo); (c) emulsão A7 (10,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárilico); (d) emulsão A8 (15,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárilico).

Tabela 13 – Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões com óleo de urucum desenvolvidas com *Cetereath 5* em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo
A5	7888	0,40
A6	20348	0,32
A7	22009	0,38
A8	28448	0,44

(A5, A6, A7 e A8 contendo 10,0% de tensoativo; 15,0% de tensoativo; 10,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárilico e 15,0% de tensoativo + 1,0% de álcool cetosteárilico, respectivamente). Onde, cP = centiPoise.

Figura 9 – Reograma obtido para as emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,2) e obtenção de cristais líquidos, 24 horas após o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento (γ).

A5: *Ceteareth-5* 10,0%;

A6: *Ceteareth-5* 15,0%;

A7: *Ceteareth-5* 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%;

A8: *Ceteareth-5* 15,0% e álcool cetoestearílico 1,0%.

Figura 10 – Representação gráfica dos valores de viscosidade aparente (μ) versus taxa de cisalhamento (γ) obtidos para as emulsões com óleo de urucum desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,2) e obtenção de cristais líquidos.

A5: *Ceteareth-5* 10,0%;

A6: *Ceteareth-5* 15,0%;

A7: *Ceteareth-5* 10,0% e álcool cetoestearílico 1,0%;

A8: *Ceteareth-5* 15,0% e álcool cetoestearílico 1,0%.

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações B10 e B11, descritas na **Tabela 4**, são apresentados na **Tabela 14**. Todas essas formulações permaneceram estáveis. O resultado da análise microscópica dessas emulsões está apresentado na **Figura 11**, que mostra homogeneidade dos glóbulos e presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar para ambas formulações.

Estas emulsões foram avaliadas em função do comportamento reológico, cuja análise foi realizada com velocidade de rotação aumentando até 40 rpm e subsequentemente conduzida ao repouso, com intervalo de 5 rpm e mantendo a rotação por 20 segundos. Os reogramas obtidos e valores de índice de fluxo e de consistência estão mostrados na **Tabela**

15 e nas **Figuras 12 e 13**. Ambas as formulações apresentam comportamento pseudoplástico e a presença de tixotropia.

Tabela 14 – Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Steareth 2*, desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Formulação	Análise macroscópica	Centrifugação
B10	N	N
B11	N	N

(B10 e B11 contendo 10,0% de tensoativo e 15,0% de tensoativo, respectivamente). onde, N = Normal (estável).

Figura 11 – Fotomicrografia das emulsões preparadas com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Steareth 2*, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B10 (10,0% de tensoativo); (b) emulsão B11 (15,0% de tensoativo). **I**: microscopia com luz polarizada; **II**: microscopia sem polarização.

Tabela 15 – Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Steareth 2*, desenvolvidas em função do valor do EHL requerido e obtenção de cristais líquidos.

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo
B10	15821	0,39
B11	34342	0,54

(B10 e B11 contendo 10,0% e 15,0% de tensoativo, respectivamente).
onde, cP = centiPoise.

Figura 12 – Reograma obtido para as emulsões com sistema de óleos desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,0) e obtenção de cristais líquidos, 24 horas após o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento (γ).
B10: *Cetereath 5* + *Steareth 2* 10,0%;
B11: *Cetereath 5* + *Steareth 2* 15,0%.

Figura 13 – Representação gráfica dos valores de viscosidade aparente (μ) versus taxa de cisalhamento (γ) obtidos para as emulsões com sistema de óleos desenvolvidas em função do valor do EHL requerido (9,0) e obtenção de cristais líquidos.
B10: *Cetereath 5* + *Steareth 2* 10,0%;
B11: *Cetereath 5* + *Steareth 2* 15,0%.

5.1.3. Diagrama de fase (diagrama ternário – óleo / tensoativo / água)

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação estão apresentados na **Tabela 16**. A análise macroscópica revelou também coloração amarela alaranjada opaca, com odor forte característico do óleo de melaleuca e baixa consistência. As formulações

mostraram-se estáveis, exceto as formulação C1, C5, C6 e C7, que apresentaram uma tênue camada oleosa na superfície.

A análise microscópica das amostras representativas da região do diagrama ternário pode ser observada pelas **Figuras 14 a 19**. As formulações apresentaram homogeneidade de glóbulos (**Figuras 14- 17**), e com luz polarizada, observou-se a presença de cristais líquidos do tipo lamelar em todas as formulações.

Tabela 16 – Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões selecionadas do diagrama de fases.

Formulação	Análise macroscópica	Ciclos do teste de centrifugação (rpm)		
		1000	2500	3500
B10	N	N	N	N
C1	N	N	N	LM
B11	N	N	N	N
C3	N	N	N	N
C4	N	N	N	N
C5	N	N	N	LM
C6	N	N	N	LM
C7	N	N	N	LM

(B10- 10,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos; C1- 15,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos; B11- 10,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos; C3- 5,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos; C4- 5,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos; C5- 10,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos; C6- 15,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos; C7- 20,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos).

onde, LM = Levemente Modificada (separação parcial); N = Normal (estável).

Figura 14 – Fotomicrografia das emulsões B10 e C1, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B10 (10,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C1 (15,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 15 – Fotomicrografia das emulsões B11 e C3, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão B11 (10,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (b) emulsão C3 (5,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 16 – Fotomicrografia das emulsões C4 e C5, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão C4 (5,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C5 (10,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 17 – Fotomicrografia das emulsões C6 e C7, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) emulsão C6 (15,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (b) emulsão C7 (20,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 18 – Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões B10, C1, B11 e C3, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão C3 (5,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (b) emulsão B11 (10,0% de fase oleosa e 15,0% de tensoativos); (c) emulsão C1 (15,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (d) emulsão B10 (10,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos).

Figura 19 – Fotomicrografia sob luz polarizada das emulsões C4, C5, C6 e C7, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 200x). (a) emulsão C7 (20,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos); (b) emulsão C6 (15,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (c) emulsão C5 (10,0% de fase oleosa e 5,0% de tensoativos); (d) emulsão C4 (5,0% de fase oleosa e 10,0% de tensoativos).

5.1.4. Determinação da velocidade de agitação no preparo das emulsões

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação estão apresentados na **Tabela 17**. Todas as formulações apresentaram-se estáveis, embora observou-se macroscopicamente presença de bolhas de ar nas emulsões B10c, B10d e B10e, que foi confirmada pela análise microscópica. O resultado da análise microscópica é mostrado nas **Figuras 20 a 23**. Identificou-se fases líquidas cristalinas lamelares em todas as formulações, exceto na formulação B10e.

A análise reológica, realizada em todas as amostras com velocidade de rotação aumentando até 200 rpm e subseqüentemente conduzidas ao repouso, com intervalo de 20 rpm e rotação mantida por 20 segundos, é apresentada nas **Figuras 24 e 25** pelos reogramas obtidos e na **Tabela 18**, pelos valores de índice de fluxo e de consistência. O estudo do perfil reológico mostrou comportamento pseudoplástico e presença de tixotropia.

Os valores de densidade e gravidade específica obtidos encontram-se na **Tabela 19**.

Tabela 17 – Resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das emulsões com sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e mistura dos tensoativos *Cetereath 5* e *Steareth 2* (10,0%) com valor de EHL 9,0, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo.

Formulação	Análise macroscópica	Ciclos do teste de centrifugação (rpm)		
		1000	2500	3500
B10a	N	N	N	N
B10b	N	N	N	N
B10c	N	N	N	N
B10d	N	N	N	N
B10e	N	N	N	N

(B10a, B10b, B10c, B10d e B10e - desenvolvidas com velocidade de agitação de 300, 600, 900, 1200 e 1500 rpm, respectivamente).
onde, N = Normal (estável).

Figura 20 – Fotomicrografia da emulsão B10a (300 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*) após 24 horas da manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I**: microscopia com luz polarizada; **II**: microscopia sem polarização.

Figura 21 – Fotomicrografia da emulsão B10b (600 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 22 – Fotomicrografia da emulsão B10c (900 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 23 – Fotomicrografia da emulsão B10d (1200 rpm, 10,0% de *Ceteareth 5* + *Seareth 2*), 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). (a) antes da análise reológica; (b) após análise reológica. **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Tabela 18 – Índice de consistência e índice de fluxo das emulsões constituídas pelo sistema de óleos (óleos de urucum, café e melaleuca) e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2* com valor de EHL 9,0, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo.

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo
B10a	9633	0,39
B10b	10973	0,31
B10c	12252	0,34
B10d	13843	0,32
B10e	17998	0,34

(B10a, B10b, B10c, B10d e B10e - desenvolvidas com velocidade de agitação de 300, 600, 900, 1200 e 1500 rpm, respectivamente). Onde, cP = centiPoise.

Figura 24 – Reograma obtido para as emulsões constituídas com sistema de óleos e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo. Tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento (γ).

B10a- 300 rpm; B10b- 600 rpm; B10c- 900 rpm; B10d- 1200 rpm; B10e- 1500 rpm.

Figura 25 – Valores de viscosidade aparente (μ) em função da taxa de cisalhamento (γ) obtidos para as emulsões constituídas com sistema de óleos e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo.

B10a- 300 rpm; B10b- 600 rpm; B10c- 900 rpm; B10d- 1200 rpm; B10e- 1500 rpm.

Tabela 19 – Valores médios da densidade (d) e gravidade específica (SG) das emulsões com valor de EHL 9,0, constituídas pelo sistema de óleos e 10,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, desenvolvidas com variação da velocidade de agitação durante o preparo

Formulação	d (g/cm ³)	SG
B10a	0,98964	0,9915
B10b	0,98038	0,9821
B10c	0,94750	0,9492
B10d	0,84554	0,8472
B10e	0,71061	0,7119

(B10a, B10b, B10c, B10d e B10e - desenvolvidas com velocidade de agitação de 300, 600, 900, 1200 e 1500 rpm, respectivamente).

5.1.5. Incorporação da cafeína

5.1.5.1. Seleção da formulação

Os resultados da análise macroscópica, do teste de centrifugação e da análise microscópica encontram-se na **Tabela 20**. Todas as emulsões (**Tabela 6**) apresentaram-se estáveis. Na análise microscópica observou-se a presença de cristais de cafeína nas emulsões D1, D2, D3 e D4; e sob polarização foram identificadas fases líquidas cristalinas do tipo lamelar estriado ou não em todas as formulações.

Tabela 20 – Resultados da análise macroscópica, teste de centrifugação e análise microscópica das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção da formulação.

Formulação	Análise macroscópica	Ciclos do teste de centrifugação (rpm)			Análise microscópica	
		1000	2500	3500	Cristal de cafeína	Cristal líquido
D1	N	N	N	N	+	+
D2	N	N	N	N	+	++
D3	N	N	N	N	+	+
D4	N	N	N	N	+	+
D5	N	N	N	N	A	+
D6	N	N	N	N	A	+++
D7	N	N	N	N	A	+
D8	N	N	N	N	A	++
D9	N	N	N	N	A	+
D10	N	N	N	N	A	++

(D1- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2* e 2,0% de cafeína; D2- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2* e 1,5% de cafeína; D3- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 2,0% de cafeína e 5,0% de propilenoglicol; D4- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 2,0% de cafeína e 5,0% de glicerina; D5- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio; D6- 15,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio; D7- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 5,0% de propilenoglicol, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio; D8- 15,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 5,0% de propilenoglicol, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio; D9- 10,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 10,0% de propilenoglicol, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio; D10- 15,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 10,0% de propilenoglicol, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio). Onde: N = Normal (estável), + = presença e A = ausência.

5.1.5.2. Seleção do processo de incorporação

Os resultados da análise macroscópica, do teste de centrifugação e da análise microscópica encontram-se na **Tabela 21**. Todas as emulsões (**D6a**, **D6b**, **D6c** e **D6d**) mostraram-se estáveis. Na análise microscópica observou-se ausência de cristais de cafeína, e com luz polarizada, presença de cristais líquidos em todas emulsões.

Tabela 21 – Resultados da análise macroscópica, teste de centrifugação e análise microscópica das emulsões com cafeína desenvolvidas em função da seleção do processo de incorporação do ativo.

Formulação	Análise macroscópica	Ciclos do teste de centrifugação (rpm)			Análise microscópica	
		1000	2500	3500	Cristal de cafeína	Cristal líquido
D6a	N	N	N	N	A	++
D6b	N	N	N	N	A	+
D6c	N	N	N	N	A	++
D6d	N	N	N	N	A	+++

(D6- 15,0% de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio – D6a- na fase aquosa; D6b- Durante a emulsificação; D6c- Após resfriamento da emulsão e D6d- 24 horas após a manipulação). Onde, N = Normal (estável), + = presença e A = ausência.

5.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A

5.2.1. Testes de Estabilidade Preliminares (TEP)

As emulsões **B11** (sem ativo) e **D6d** (com ativo: cafeína + benzoato de sódio), previamente selecionadas, foram submetidas aos Testes de Estabilidade Preliminares vinte e quatro horas após a manipulação (**Tabela 22**).

Tabela 22 – Composição das formulações desenvolvidas com 15,0% da mistura de *Ceteareth 5* + *Steareth 2*, sem ou com ativo (cafeína + benzoato de sódio).

Matéria-prima	Formulação (%) (p/p)	
	B11	D6d
Óleo de urucum	8,0	8,0
Óleo de café	1,0	1,0
Óleo de melaleuca	1,0	1,0
<i>Ceteareth 5</i> + <i>Steareth 2</i>	15,0	15,0
Cafeína	-	1,0
Benzoato de Sódio	-	1,0
Água destilada <i>q.s.p.</i>	100,0	100,0

Os resultados da análise macroscópica, teste de centrifugação, determinação dos valores de pH e condutividade encontram-se na **Tabela 23** e do estresse térmico na **Tabela 24**. As emulsões mostraram-se estáveis macroscopicamente, sendo então submetidas aos demais testes. Na análise macroscópica estas apresentaram coloração amarela alaranjada opaca, com odor forte característico do óleo de melaleuca, bem como uma emulsão de baixa consistência. A análise microscópica, mostrada pelas **Figuras 26** e **27**, revelou homogeneidade dos glóbulos e, com luz polarizada identificou-se presença de cristais líquidos do tipo lamelar.

Tabela 23 – Resultados dos Testes de Estabilidade Preliminares das emulsões B11 (15,0% de tensoativo) e D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio).

Formulação	Análise macroscópica	Análise microscópica		Ciclos do teste de centrifugação (rpm)			Valor de pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
		Cristal cafeína	Cristal líquido	1000	2500	3500		
B11	N	-	+++	N	N	N	6,32 $\pm$ 0,0	5,18 $\pm$ 0,2
D6d	N	A	+++	N	N	N	6,41 $\pm$ 0,0	18,78 $\pm$ 0,0

onde, N = Normal, LM = levemente modificada, - = não testada, A = ausência. Os valores de pH e condutividade estão apresentados como a média e o desvio-padrão.

Tabela 24 – Resultado do estresse térmico das emulsões B11 (15,0% de tensoativo) e D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio).

Formulação	Estresse térmico ($^{\circ}\text{C}$)								
	40	45	50	55	60	65	70	75	80
B11	N	N	N	N	N	N	M	M	M
D6d	N	N	N	N	N	N	N	M	M

onde, M = Modificada (separação de fases); LM = Levemente Modificada (separação parcial); N = Normal (estável); - = não testada.

Figura 26 – Fotomicrografia da emulsão B11 (15,0% de tensoativo) antes do estresse térmico, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) (aumento de 400x). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 27 – Fotomicrografia da emulsão D6d (15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio) antes do estresse térmico, 24 horas após a manipulação e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (aumento de 400x). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

5.2.2. Teste de Estabilidade Acelerado (TEA)

As emulsões previamente analisadas pelos testes preliminares de estabilidade foram submetidas aos Testes de Estabilidade Acelerada. Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação estão apresentados na **Tabela 25**.

As amostras, avaliadas macroscopicamente a cada mudança de temperatura durante a realização do teste (TEA), permaneceram com coloração amarela alaranjada opaca, odor forte característico do óleo de melaleuca e estáveis, apresentando visualmente apenas gotículas de fase oleosa na superfície quando submetidas à temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ (Estufa), porém não apresentaram sinais de instabilidade após os ciclos da centrifugação.

Os valores de pH e de condutividade elétrica obtidos para as formulações encontram-se na **Tabela 26**. A variação nesses valores de pH e de condutividade elétrica durante o período de estudo é mostrada nas **Figuras 28 e 29** respectivamente.

O resultado da análise microscópica, em relação à formação de fases líquidas cristalinas e cristais de cafeína (recristalização), durante o período de estudo encontra-se na

Tabela 27. Os aspectos microscópicos observados 24 horas após o preparo das formulações e após 30 dias armazenadas nas condições variadas são mostrados nas **Figuras 30 e 31**.

Tabela 25 – Resultado da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento.

Condições	Dias	Parâmetros analisados			
		Macroscópico		Centrifugação	
		Formulação		Formulação	
		B11	D6d	B11	D6d
Temperatura ambiente (25±2°C)	1°	N	N	N	N
	7°	N	N	-	-
	15°	N	N	-	-
	30°	N	N	N	N
Estufa (45±2°C)	7°	N	N	-	-
	15°	LM	LM	-	-
	30°	LM	LM	N	N
Geladeira (4±2°C)	7°	N	N	-	-
	15°	N	N	-	-
	30°	N	N	N	N
Ciclo gela- degela	12°	N	N	N	N

(B11- 15,0% de tensoativo e D6d- 15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio). Onde, N = Normal, LM = levemente modificada, - = não testado.

Tabela 26 – Valores de pH e de condutividade elétrica das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento.

Condições	Dias	Parâmetros analisados			
		Valor de pH		Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
		Formulação		Formulação	
		B11	D6d	B11	D6d
Temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$)	1°	6,45 $\pm$ 0,0	6,58 $\pm$ 0,2	4,70 $\pm$ 0,1	20,9 $\pm$ 0,1
	7°	6,46 $\pm$ 0,0	6,50 $\pm$ 0,0	4,99 $\pm$ 0,1	21,8 $\pm$ 0,5
	15°	6,40 $\pm$ 0,0	6,41 $\pm$ 0,0	5,03 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,4
	30°	6,35 $\pm$ 0,0	6,45 $\pm$ 0,0	4,96 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 0,3
Estufa ($45\pm 2^\circ\text{C}$)	7°	5,87 $\pm$ 0,1	6,20 $\pm$ 0,0	4,96 $\pm$ 0,2	21,9 $\pm$ 0,1
	15°	5,64 $\pm$ 0,0	6,14 $\pm$ 0,0	5,06 $\pm$ 0,1	22,55 $\pm$ 0,2
	30°	5,59 $\pm$ 0,1	6,21 $\pm$ 0,0	5,23 $\pm$ 0,1	22,65 $\pm$ 0,5
Geladeira ($4\pm 2^\circ\text{C}$)	7°	6,27 $\pm$ 0,1	6,34 $\pm$ 0,1	5,09 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1
	15°	6,37 $\pm$ 0,0	6,25 $\pm$ 0,0	5,17 $\pm$ 0,1	21,45 $\pm$ 0,2
	30°	6,40 $\pm$ 0,1	6,37 $\pm$ 0,0	5,06 $\pm$ 0,3	21,5 $\pm$ 0,1
Ciclo gela- degela	12°	6,36 $\pm$ 0,1	6,55 $\pm$ 0,1	5,07 $\pm$ 0,2	21,2 $\pm$ 0,3

(B11- 15,0% de tensoativo e D6d- 15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio).
Os valores de pH e condutividade estão apresentados como a média e o desvio-padrão.

Figura 28 – Variação de pH das formulações B11 e D6d quando armazenadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. pH/pHo = razão do valor de pH num determinado tempo pelo valor de pH inicial (24 horas após o preparo).

Figura 29 – Variação de condutividade elétrica das formulações B11 e D6d quando armazenadas à temperatura ambiente (25 ±2°C), 45 ±2°C e 4 ±2°C por 30 dias. μ/μ_0 = razão do valor de condutividade num determinado tempo pelo valor de condutividade inicial (24 horas após o preparo).

Tabela 27 – Resultado da análise microscópica das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), nas diferentes condições de armazenamento.

Análise Microscópica				
Condições	Dias	Cristal líquido		Cristal de Cafeína
		Formulação		Formulação
		B11	D6d	D6d
Temperatura ambiente (25±2°C)	1°	+++	+++	A
	7°	+++	+++	A
	15°	+++	+++	A
	30°	+++	+++	A
Estufa (45±2°C)	7°	+++	+++	A
	15°	+++	+++	A
	30°	+++	+++	A
Geladeira (4±2°C)	7°	+++	+++	A
	15°	+++	+++	A
	30°	+++	+++	A
Ciclo gela- degela	12°	+++	+++	A

(B11- 15,0% de tensoativo e D6d- 15,0% de tensoativo, 1,0% de cafeína e 1,0% de benzoato de sódio).
onde, A = ausência de cristais de cafeína; + = presença de cristais líquidos.

Figura 30 – Fotomicrografias da emulsão B11: (a) 24 horas após a manipulação (temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$); (b) após o ciclo gela/degela; (c) após 30 dias armazenada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); (d) após 30 dias armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$; (e) após 30 dias armazenada a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. (aumento de 400x). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

Figura 31 – Fotomicrografias da emulsão **D6d**: (a) 24 horas após a manipulação (temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$); (b) após o ciclo gela/degela; (c) após 30 dias armazenada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); (d) após 30 dias armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$; (e) após 30 dias armazenada a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. (aumento de 400x). **I**: microscopia sem polarização; **II**: microscopia com luz polarizada.

5.3. Avaliação da liberação da cafeína *in vitro*

5.3.1. Construção da Curva de Calibração em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 – Espectrofotometria

A varredura da solução de cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5, que tinha concentração de 2,0 µg/ml, está apresentado pela **Figura 32**. O comprimento de onda (λ – nm) onde a amostra apresentou pico máximo de absorbância (0,124) foi 273 nm.

Figura 32 – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) *versus* absorbância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de cafeína a 2,0 µg/ml em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5.

A concentração (µg/ml) *versus* valores de absorbância foram plotados para a obtenção da curva de calibração da cafeína em solução tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 e submetidos a análise de regressão linear para obter-se a equação da reta, que estão representadas na **Figura 33**.

Figura 33 – Representação gráfica da concentração (µg/ml) *versus* absorbância (ABS), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 pela espectrofotometria.

5.3.2. Solubilidade da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5

A solubilidade da cafeína foi determinada a partir de solução obtida diluindo-se alíquotas do sobrenadante em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 na concentração de 0,5 µl/ml. A solubilidade em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 foi calculada como sendo 19,86 mg/ml, conforme a equação da reta obtida pela análise de regressão linear da curva de calibração da cafeína (**Figura 33**).

5.3.3. Avaliação da liberação da cafeína – Diálise

Através da equação da reta obtida pela curva de calibração da cafeína em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5, construída pela espectrofotometria, a quantidade de ativo liberada foi calculada, apresentada na **Tabela 28** e **Tabela 29**, e plotada em função do tempo (horas), traçando assim o perfil de liberação da cafeína a partir das formulações B11c e formulação D6d, mostrado pelas **Figuras 34** e **36**, respectivamente. A **Figura 38** mostra os

perfis de liberação das duas formulações visando comparação. Os parâmetros cinéticos da liberação da cafeína a partir das duas formulações desenvolvidas, fluxo (J) e coeficiente de correlação linear (r^2) estão apresentados na **Tabela 30**.

Tabela 28 – Resultado da avaliação da liberação da cafeína por diálise: quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c).

Tempo (horas)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Correção diluição (μg)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CV (%)
1,0	3,45 $\pm$ 1,29	20,70 $\pm$ 7,73	25,87 $\pm$ 9,66	37,35
2,0	11,05 $\pm$ 3,66	78,46 $\pm$ 23,95	98,08 $\pm$ 29,94	30,53
3,0	19,77 $\pm$ 4,03	147,43 $\pm$ 29,53	184,29 $\pm$ 36,91	20,03
4,0	27,80 $\pm$ 4,10	218,92 $\pm$ 33,41	273,65 $\pm$ 41,76	15,26
5,0	33,83 $\pm$ 1,57	283,55 $\pm$ 1,90	354,44 $\pm$ 2,37	0,67
6,0	32,51 $\pm$ 0,16	302,91 $\pm$ 6,40	378,63 $\pm$ 8,00	2,11
7,0	32,04 $\pm$ 1,20	327,03 $\pm$ 15,58	408,78 $\pm$ 19,47	4,76
8,0	31,34 $\pm$ 1,58	349,13 $\pm$ 19,19	436,41 $\pm$ 23,99	5,50
9,0	32,56 $\pm$ 0,26	383,80 $\pm$ 11,50	479,76 $\pm$ 14,38	3,00
10,0	32,77 $\pm$ 0,47	412,57 $\pm$ 6,72	515,71 $\pm$ 8,40	1,63
11,0	31,98 $\pm$ 0,70	434,71 $\pm$ 4,72	543,39 $\pm$ 5,90	1,09
12,0	31,6 $\pm$ 0,54	458,95 $\pm$ 5,23	573,69 $\pm$ 6,54	1,14

Os valores estão apresentados como a média e o desvio-padrão.

Figura 34 – Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (horas) mostrando o perfil de liberação (1ª e 2ª fase) por diálise da cafeína a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c).

Figura 35 – Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus $\sqrt{\text{tempo}}$ (horas) mostrando o perfil de liberação (pseudo 1ª ordem) por diálise da cafeína a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação B11c).

Tabela 29 – Resultado da avaliação da liberação da cafeína+benzoato por diálise: quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d).

Tempo (horas)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Correção diluição (μg)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CV (%)
1,0	$2,96 \pm 0,07$	$17,78 \pm 2,96$	$22,22 \pm 0,55$	2,47
2,0	$4,78 \pm 0,51$	$35,22 \pm 4,78$	$44,02 \pm 4,30$	9,78
3,0	$7,25 \pm 1,80$	$56,09 \pm 7,25$	$70,11 \pm 15,86$	22,62
4,0	$8,16 \pm 1,65$	$68,41 \pm 8,16$	$85,51 \pm 16,50$	19,29
5,0	$8,36 \pm 1,61$	$76,61 \pm 8,36$	$95,76 \pm 17,86$	18,65
6,0	$8,13 \pm 1,84$	$82,07 \pm 8,13$	$102,58 \pm 21,55$	21,01
7,0	$8,12 \pm 1,98$	$88,82 \pm 8,12$	$111,03 \pm 24,61$	22,17
8,0	$7,62 \pm 1,74$	$92,24 \pm 7,62$	$115,31 \pm 24,69$	21,41
9,0	$7,21 \pm 1,48$	$95,81 \pm 7,21$	$119,77 \pm 24,26$	20,26
10,0	$7,27 \pm 1,62$	$102,30 \pm 7,27$	$127,87 \pm 27,07$	21,17
11,0	$6,48 \pm 1,86$	$103,08 \pm 6,48$	$128,77 \pm 30,78$	23,90
12,0	$6,29 \pm 1,43$	$107,12 \pm 6,29$	$133,90 \pm 29,10$	21,73

Os valores estão apresentados como a média e o desvio-padrão.

Figura 36 – Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (horas) mostrando o perfil de liberação (1ª e 2ª fase) por diálise da cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d).

Figura 37 – Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* $\sqrt{\text{tempo}}$ (horas) mostrando o perfil de liberação (pseudo 1ª ordem) por diálise da cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulação D6d).

Figura 38 – Representação gráfica da quantidade de cafeína liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (horas) mostrando o perfil de liberação por diálise da cafeína e cafeína+benzoato de sódio a partir de emulsão contendo cristal líquido (formulações B11c e D6d, respectivamente).

Tabela 30 – Parâmetros cinéticos de liberação da cafeína por diálise a partir das emulsões contendo cristal líquido (formulação B11c e D6d).

Formulações	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)		r^2	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
B11c	83,271	33,347	0,9988	0,9967
D6d	21,595	5,3915	0,9909	0,9788

onde, J = fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de calibração (*steady state*); r^2 = coeficiente de correlação linear.

5.3.4. Comparação da metodologia de análise da cafeína – Eletroforese Capilar (CE)

5.3.4.1. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Espectrofotometria

A varredura da solução de cafeína em tampão borato pH 10,0, que tinha concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, está apresentado pela **Figura 39**. O comprimento de onda (λ – nm) onde a amostra apresentou pico máximo de absorbância (0,0724) foi 273 nm.

Figura 39 – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) versus absorvância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de cafeína a 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em tampão borato pH 10,0.

Para a obtenção da curva de calibração da cafeína em solução tampão borato pH 10,0, os valores de absorbância obtidos versus concentração ($\mu\text{g/ml}$) foram plotados e submetidos a análise de regressão linear para obter-se a equação da reta, que está representada na **Figura 40**.

Figura 40 – Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) versus absorbância (ABS), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão borato pH 10,0 pela espectrofotometria.

5.3.4.2. Solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0

A partir de solução obtida diluindo-se alíquotas do sobrenadante em solução tampão borato pH 10,0 na concentração de 0,01 ml/ml determinou-se a solubilidade da cafeína em solução tampão borato pH 10,0 como 17,415 mg/ml, conforme a equação da reta obtida pela análise de regressão linear da curva de calibração da cafeína (**Figura 40**).

5.3.4.3. Construção da Curva de Calibração em tampão borato pH 10,0 – Eletroforese Capilar (CE)

Os valores da área do pico (mAU) obtidos *versus* concentração ($\mu\text{g/ml}$) foram plotados para a obtenção da curva de calibração da cafeína e do benzoato de sódio em solução tampão borato pH 10,0. Esses foram submetidos a análise de regressão linear para obter-se a equação da reta e estão representados nas **Figura 41** para cafeína e **Figura 42** para benzoato de sódio.

Figura 41 – Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) *versus* área do pico (mAU), em função da obtenção da curva de calibração da cafeína em tampão borato pH 10,0 pela eletroforese capilar (CE).

Figura 42 – Representação gráfica da concentração ($\mu\text{g/ml}$) *versus* área do pico (mAU), em função da obtenção da curva de calibração do benzoato de sódio em tampão borato pH 10,0 pela eletroforese capilar (CE).

5.3.4.4. Avaliação da liberação da cafeína – Sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”)

Através da equação da reta obtida pela curva de calibração construída pela eletroforese capilar (CE), a quantidade de cafeína e benzoato de sódio liberada da formulação F1 foi calculada e encontra-se apresentada na **Tabela 31**.

Tabela 31 – Resultado da quantificação de cafeína e benzoato de sódio liberada a partir de microemulsão (formulação F1) após 1 hora através de Sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”) e analisada por eletroforese capilar (CE).

Substância	Concentração (µg/ml)	Correção diluição (µg)	Q (µg/cm ²)	CV (%)
Cafeína	72,49 ± -	144,98 ± -	36,24 ± -	-
Benzoato de sódio	44,17 ± 2,73	88,34 ± 5,46	22,08 ± 1,36	6,18

Os valores estão apresentados como a média e o desvio-padrão.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento das emulsões O/A

Emulsão é o tipo mais comum de sistema de liberação usado para produtos cosméticos (SCHUELLER & ROMANOWSKI, 1998), apresentando qualidades desejadas como compatibilidade, aceitação pelo consumidor, características físicas, economia, entre outras. Entretanto, esses sistemas apresentam também desvantagens como instabilidade física, sendo o desenvolvimento de produtos estáveis de grande importância no campo da tecnologia cosmética e farmacêutica (AYANNIDES & KTISTIS, 2002).

Para o desenvolvimento desses sistemas é necessário escolher os componentes para se atingir os critérios desejados: eficácia, segurança, elegância cosmética e aceitação do consumidor (FOX, 1986). Os componentes oleosos são responsáveis por características importantes, como espalhamento, absorção, viscosidade, sensação lubrificante e toque na pele (SANCTIS, 1999).

Como emulsões são termodinamicamente instáveis, um grau de estabilidade adequado com o tempo pode ser obtido com o uso de tensoativos apropriados (REALDON *et al.*, 2002). Dessa maneira, a seleção do agente emulsificante correto que irá suprir os critérios desejados e produzir emulsões estáveis se faz necessária (FOX, 1986), sendo uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de sistemas emulsionados (KNOWLTON & PEARCE, 1996).

Um parâmetro de grande importância no desenvolvimento de emulsões cosméticas é a avaliação dos valores de EHL requerido. O sistema EHL é o método mais usado para escolha do tensoativo. Esse sistema desenvolvido por Griffin procura determinar a razão correta de tensoativo capaz de estabilizar um sistema emulsificado (LOCHHEAD, 1994; SANTOS *et*

al., 2005), através da compatibilização do EHL do tensoativo com o da fase oleosa, seja ela composta por um único óleo ou mistura de óleos (KNOWLTON & PEARCE, 1996; SANCTIS, 1999; SCHUELLER & ROMANOWSKI, 1998).

Assim, neste trabalho procurou-se desenvolver emulsões O/A com fase oleosa composta por óleos vegetais utilizando o Sistema EHL, que possibilitou a determinação do valor do EHL requerido do óleo de urucum e sistema de óleos (óleo de urucum, de café e de melaleuca) com obtenção de emulsões estáveis utilizando tensoativos não-iônicos.

De acordo com o teste de determinação do valor de EHL para a fase oleosa contendo apenas óleo de urucum, a emulsão que se apresentou estável, segundo parâmetros analisados, foi desenvolvida com 15,0% de sistema tensoativo na proporção que obteve valor de EHL 9,2, visto que aquelas com 5,0% (A1) e 10,0% (A2) de tensoativos apresentaram separação de fases macroscopicamente, exceto aquelas com concentração de 10,0% e valor de EHL entre 7,0 e 8,0, que foram estáveis macroscopicamente, entretanto, separação de fases ocorreu após o teste de centrifugação. Já nas emulsões com 12,0% de tensoativos (A3), aquelas desenvolvidas com valor de EHL entre 8,0 e 9,0 foram macroscopicamente estáveis, embora dentre estas apenas a amostra com valor de EHL 9,0 apresentou separação de fases consideravelmente menor após os três ciclos da centrifugação.

Assim, considerou-se ainda baixa a concentração de tensoativos para essa formulação, sendo necessário o desenvolvimento de emulsões com 15,0% de tensoativos (A4), as quais foram testadas somente na faixa de valor de EHL entre 8,2 e 9,2 com intervalo de 0,2 entre cada valor, levando-se em conta o resultado das emulsões com 12,0% de tensoativos. Todas as amostras apresentaram estabilidade macroscópica. Entretanto, a emulsão desenvolvida com 15,0% (A4) de sistema tensoativo na proporção que obteve valor de EHL 9,2 permaneceu estável, ou seja, não apresentou separação de fases macroscopicamente antes ou após ser submetida aos ciclos da centrifugação, o que não ocorreu com as demais formulações.

Segundo os parâmetros analisados, considerou-se que esta emulsão apresentou estabilidade, o que possibilitou estabelecer o valor do EHL requerido do óleo de urucum.

Para a determinação do valor de EHL requerido para fase oleosa contendo sistema de óleos, constituído por óleo de urucum, de café e de melaleuca, a determinação do valor de EHL do óleo de urucum foi levada em consideração, restringindo assim a faixa de EHL estudado para 7,0 - 10,2.

Neste estudo as formulações desenvolvidas com 5,0% (B1) e 10,0% (B2) de mistura de tensoativos (*Oleth 3* e *Oleth 20*) apresentaram-se macroscopicamente instáveis, exceto aquelas com 10% de tensoativos (B2) na faixa de valor de EHL 7,4 - 9,4, porém nestas ocorreu separação de fases durante o teste de centrifugação. Dessa forma, foram desenvolvidas emulsões com 15,0% de tensoativos (B3), que na faixa de EHL 7,4 - 9,2 apresentaram estabilidade macroscópica, embora dentre estas permaneceram aparentemente estáveis após a centrifugação apenas as emulsões com valores de EHL 9,0 e 9,2.

Sendo assim, houve a necessidade de se testar novamente estes dois valores de EHL que foi feito variando-se a concentração dos agentes emulsificantes entre 10,0 e 15,0%, com intervalo de 1,0 entre cada um deles (**Tabela 2**).

As formulações desenvolvidas com 10,0% (B4); 11,0% (B5) e 12,0% (B6) foram macroscopicamente instáveis para ambos os valores de EHL, com 13,0% (B7) somente aquela com valor de EHL 9,0 foi macroscopicamente estável, mas apresentou separação de fases após centrifugação. Para as formulações com 14,0% (B8) e 15,0% (B9) apenas as com valor de EHL 9,0 não tiveram separação de fases após serem submetidas aos três ciclos do teste de centrifugação, considerando este como o valor do EHL requerido para o sistema de óleos.

A estabilização de emulsões pelo uso tensoativos não-iônicos se faz através de impedimento estérico e pontes de hidrogênio. A porção não polar do tensoativo se insere nas partículas do óleo e os grupos de óxido de etileno na fase aquosa. Os grupos de óxido de

etileno causam impedimento estérico que inibe as partículas de óleo sofrerem colisão e coalescer, além de formarem pontes de hidrogênio com a água (FOX, 1986; SILVA & SOARES, 1996). Entretanto, a estabilização de emulsões pode também ser obtida usando concentração mais elevada de agentes emulsificantes, pois isso resultará num filme ao redor das gotículas de óleo mais firme e compacto reduzindo a coalescência (FOX, 1986).

A instabilidade pode se manifestar sob a forma de cremeação (com ou sem agregação e aumento do tamanho da partícula), floculação (com ou sem cremeação), aumento do diâmetro da partícula (diminuição da área interfacial) e coalescência, resultando em fases separadas (RIEGER, 1996).

A análise macroscópica e centrifugação foram utilizadas para selecionar a formulação estável, pois segundo Idson (1993a) a avaliação visual da aparência da emulsão é um método claro de detecção de separação de fases ou instabilidade, podendo fornecer informações consideráveis, como emulsões separadas em duas ou mais fases, considerada como instável.

O teste de centrifugação é um método que permite avaliar a estabilidade de diferentes emulsões, fornecendo informações rápidas sobre a separação de fases da dispersão avaliando a coalescência ou a cremeação, podendo dessa forma, prever se o produto irá separar em função do tempo (AZZINI, 1999; CADWALLADER, 1989; IDSON, 1993b; SILVA & SOARES, 1996).

O sistema EHL é muito utilizado, mas também não exclui as séries de ensaios empíricos que devem ser integradas a valores práticos. (ANSMANN *et al.*, 1996; LOCHHEAD, 1994; SILVA & SOARES, 1996). Santos *et al.* (2005) utilizaram o mesmo método de determinação do valor de EHL requerido para a obtenção de emulsão O/A contendo óleo de canola como fase oleosa. Para o estudo utilizaram a mistura de tensoativo *Ceteth 2* e *Ceteareth 20*, concluindo que o valor de EHL requerido do óleo de canola para esta emulsão O/A é 6,0 de acordo com o método utilizado. Morais *et al.* (2005) obtiveram o valor

de EHL do óleo de urucum através da utilização da mistura de tensoativos *Oleth 3* e *Oleth 20*. Segundo Morais *et al.* (2005) e Santos *et al.* (2005), este mesmo método possibilitou a determinação do valor de EHL requerido para emulsões O/A constituídas por óleos vegetais.

Uma vez determinado o valor de EHL requerido para o óleo de urucum e para o sistema de óleos (óleo de urucum, de café e de melaleuca) outras formulações foram desenvolvidas mantendo o obtido valor de EHL requerido, com o intuito de obter fases líquidas cristalinas, visto que naquelas emulsões compostas por *Oleth 3* e *Oleth 20* não foram observadas formação de fases líquidas cristalinas sob microscopia de polarização.

Emulsões cosméticas contendo cristais líquidos apresentam propriedades muito interessantes para uso nos campos dermatológico, físico e químico (MASSON *et al.* 2005). Pode-se destacar como vantagens o aumento da hidratação cutânea, liberação prolongada de ativos e estabilização de emulsões (MASSARO *et al.*, 2003).

Considerando que derivados de ácidos ou álcoois graxos de cadeia longa formam fase líquida cristalina (ALI & MULLEY, 1978; DELONCA *et al.*, 1982; ECCLESTON, 1990; LOCHHEAD, 1994), as formulações com óleo de urucum (A5, A6, A7 e A8- **Tabela 3**) foram produzidas nas concentrações de 10,0 e 15,0% substituindo-se a mistura de tensoativos (*Oleth 3* e *Oleth 20*) por *Ceteareth 5*, que tem o mesmo valor de EHL (9,2) conforme previamente determinado para o óleo de urucum. Além disso, o álcool cetosteárilico foi adicionado, devido à sua capacidade em formar fases líquidas cristalinas e influenciar os aspectos reológicos da emulsão (DAHMS, 1986; KLEIN, 2002; SANTOS *et al.*, 2005). Nenhuma destas emulsões apresentou instabilidade macroscópica ou separação de fases após serem submetidas aos ciclos da centrifugação, permanecendo estáveis (**Tabela 12**).

Áreas anisotrópicas foram observadas sob microscopia de luz polarizada indicando a presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar em todas as emulsões desenvolvidas utilizando *Ceteareth 5* como agente tensoativo (formulações A5, A6, A7 e A8). As emulsões

que tiveram a concentração da mistura de tensoativos aumentada de 10,0 para 15,0% (A6 e A8) apresentaram maior formação de fase líquida cristalina, bem como as amostras em que foram adicionadas *álcool cetoestearílico* (A7 e A8). Deste modo, a formulação A8 (15,0% de tensoativo e 1,0% de *álcool cetoestearílico*) apresentou campo microscópico repleto com esta estrutura líquida cristalina (**Figura 8**).

Dahms (1986) relata que cristais líquidos são formados na presença de modificadores reológicos tais como álcool estearílico, cetílico e álcool cetoestearílico. Segundo Eccleston (1997), Klein (2002) e Sanctis (1999) os álcoois graxos de cadeia longa, como o cetoestearílico, na presença de tensoativos não-iônicos formam mesofases lamelares, pois se posicionam entre as moléculas de tensoativo e se intumescem devido à hidratação das cadeias de polioxietileno do tensoativo.

As formulações contendo sistema de óleos como fase oleosa (B10 e B11- **Tabela 4**) foram produzidas nas concentrações de 10,0 e 15,0% substituindo a mistura de tensoativos (*Oleth 3* e *Oleth 20*) por outra mistura de tensoativos, composta por *Ceteareth 5* e *Steareth 2*, que apresentam valores de EHL 9,2 e 4,7 respectivamente, na proporção adequada a fim de obter o valor de EHL requerido conforme determinado (9,0).

A opção pelos tensoativos *Ceteareth 5* e *Steareth 2* foi feita levando-se em consideração a seleção feita para as formulações com óleo de urucum, que utilizou *Ceteareth 5* (MORAIS *et al.*, 2005), e algumas pesquisas sobre influências de tensoativos na formação de cristais líquidos, como realizado por Brinon *et al.* (1998), Delonca *et al.* (1982) e Santos *et al.* (2005), que utilizaram *Steareth 2* em misturas de tensoativos obtendo emulsões com cristais líquidos.

Essas formulações B10 e B11 não apresentaram instabilidade macroscópica ou separação de fases após serem submetidas aos três ciclos da centrifugação, permanecendo estáveis (**Tabela 14**). Através da microscopia foi possível observar homogeneidade dos

glóbulos e, sob luz polarizada, identificar a presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar para as duas formulações.

Os cristais líquidos lamelares foram identificados por Santos *et al.* (2005), Brinon *et al.* (1998) e Dahms (1986), que também utilizaram álcoois graxos etoxilados com diferentes graus de etoxilação. Brinon *et al.* (1998) relatam presença de mesofases lamelares quando utilizaram mistura de tensoativo *Steareth 2* e *Steareth 21*. Santos *et al.* (2005) quando estudaram a influência do tipo de tensoativo na formação de cristal líquido através de mudanças no grau de etoxilação e no tamanho da cadeia carbônica do tensoativo através de análises microscópicas utilizando misturas de tensoativos lipofílicos, *Ceteth 2* e *Steareth 2* com tensoativos hidrofílicos, *Ceteth 10*, *Ceteareth 5*, *Ceteareth 20* e *Steareth 20*; também observaram a formação de cristal líquido em todas as emulsões.

A emulsão B11 (15,0%) apresentou camadas de cristal líquido ao redor dos glóbulos mais espessa comparada à B10 (10,0%), provavelmente decorrente de um excesso de tensoativo.

Eccleston & Beattie (1989) e Ribeiro *et al.* (2004) relatam que sistemas aquosos contendo combinações de tensoativos, fases adicionais como mesofases lamelares geralmente formam quando o emulsificante em excesso daquele requerido para formar filme monomolecular na interface da gotícula de óleo, interage com a água da fase contínua.

Segundo Dahms (1986), numa emulsão normal as gotículas de óleo são revestidas por uma única camada de tensoativo, ao passo que em fases líquidas cristalinas lamelares as gotículas de óleo são rodeadas por muitas bicamadas contendo o emulsificante.

Observou-se nestas emulsões que, como aconteceu para as emulsões com óleo de urucum (MORAIS *et al.*, 2005), a formação de cristais líquidos influenciou de forma positiva a estabilidade, possibilitando a obtenção de emulsões estáveis com 10,0% de mistura de tensoativos.

De acordo com Brinon *et al.* (1998), Friberg (1971) e Klein (2002), os cristais líquidos do tipo lamelar são responsáveis pela estabilização de emulsões, sendo essa contribuição na estabilidade devido às estruturas lamelares que podem formar uma suposta proteção ao redor dos glóbulos prevenindo a adesão e coalescência. Provavelmente isto justificaria a obtenção da emulsão estável com 10,0% de tensoativo, visto que as emulsões desenvolvidas com *Oleth 3* e *Oleth 20* apresentaram estabilidade apenas com 15,0% de tensoativo.

Delonca *et al.* (1982) realizaram estudo sobre as emulsões O/A com óleo vegetal e tensoativos não-iônicos comparando estearatos com oleatos. Relatam que as emulsões mais estáveis foram obtidas com emulsificante lipofílicos de cadeia longa e saturada: esteárica e estearílica, pois a cadeia longa penetra mais profundamente na gotícula de óleo e é menos rígida em relação à rotação do que a cadeia oléica que apresenta dupla ligação, bem como apresentam porção polar reduzida em relação aos oleatos que é favorável à formação de fases lamelares.

Além disso, Silva & Soares (1996) relatam que apesar do sistema EHL ser útil, não há segurança de que uma emulsão estável, preparada com emulsificantes de determinada classe química, com valor de EHL particular, possa ser mantida ao se utilizar uma outra classe de emulsificante com o mesmo EHL, pois é importante também a afinidade química entre os componentes da fase oleosa e os agentes emulsificantes presentes.

Essas emulsões que apresentaram formação de cristais líquidos foram também avaliadas em função da determinação do perfil reológico.

A reologia das emulsões é uma das propriedades mais importantes na produção de emulsões, tanto em relação à sua influência na aceitabilidade do consumidor, como de seu impacto no processo de fabricação e estabilização da emulsão. Em termos práticos determina características como aparência, sensação e modo como a emulsão espalha na pele. Emulsões

normalmente apresentam comportamento não-Newtoniano, ou seja, sua viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento (ALMEIDA & BAHIA, 2003; GAO *et al.*, 2003; KNOWLTON & PEARCE, 1996; SANCTIS, 1999). São ainda classificadas quanto ao tipo de escoamento, sendo emulsões exemplos de sistemas que exibem comportamento pseudoplástico, que se caracteriza pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação (ALMEIDA & BAHIA, 2003). Da mesma maneira, composições líquidas cristalinas apresentam alta viscosidade e a fase lamelar exibe reologia pseudoplástica (LOCHHEAD, 1994; LOCHHEAD *et al.*, 1986).

Todas as formulações com óleo de urucum (A5, A6, A7 e A8- **Tabela 3**) ou contendo sistema de óleos como fase oleosa (B10 e B11- **Tabela 4**) apresentaram fluxo não-Newtoniano pseudoplástico, visto que apresentaram índice de fluxo menor que 1 ($\eta < 1$) (**Tabelas 13 e 15**), que pode ser observado pela curva característica deste tipo de material (**Figuras 9 e 10, 12 e 13**) (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

Pode-se dizer que a emulsão B10 (10,0%) quando comparada à B11 (15,0%), apresenta comportamento pseudoplástico mais acentuado, ou seja, quanto menor o índice de fluxo (η) (mais distante de 1) mais rapidamente a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (GAO *et al.*, 2003).

Este comportamento pseudoplástico é adequado para produtos indicados para aplicação tópica, pois após a aplicação da tensão (stress) a emulsão apresenta facilidade para fluir, refletindo bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na pele (GAO *et al.*, 2003).

Como apresentado pelos reogramas (**Figuras 9 e 10, 12 e 13**), os valores de viscosidade diminuíram com o aumento da taxa de cisalhamento, e com a diminuição deste cisalhamento, retornou aos valores elevados de viscosidade, porém não retornou imediatamente aos valores iniciais, originando assim área de histerese, ou seja, área formada

pelas curvas ascendente e descendente nos reogramas, indicando a presença de tixotropia em todas as amostras (**Figuras 9 e 10, 12 e 13**).

A tixotropia é uma alteração da viscosidade em função do tempo de deformação, ou seja, cisalhamento aplicado à amostra, sendo essa alteração representada pela perda da viscosidade do sistema. Esse fenômeno é reversível, retomando a sua viscosidade inicial algum tempo após cessar a deformação, porém não recupera completamente seu estado inicial após um estado de repouso (ALMEIDA & BAHIA, 2003).

Observa-se também, que com o aumento da concentração de tensoativos de 10,0 para 15,0% a viscosidade aumentou, bem como com a adição de 1,0% de *álcool cetoestearílico*, assim as emulsões A8 (15,0% de tensoativo e 1,0% de *álcool cetoestearílico*) e B11 (15,0% de tensoativo) apresentaram valores de viscosidade mais elevados em comparação às demais (**Figuras 9 e 10, 12 e 13**). Isso ocorre, pois o aumento da concentração de tensoativos diminui o tamanho das partículas de óleo e aumenta a viscosidade e estabilidade da emulsão (KLEIN, 1984; KNOWLTON & PEARCE, 1996). Para tanto, o tipo e a concentração de tensoativos influenciam a estabilização e propriedades reológicas de emulsões (DAHMS, 1991).

Dahms (1986) relata que nas fases líquidas cristalinas lamelares as gotículas de óleo são rodeadas por muitas bicamadas contendo o emulsificante. Concentração mais elevada de agentes emulsificantes resultará num filme ao redor das gotículas de óleo mais firme, compacto e viscoso (BRINON *et al.*, 1998; FOX, 1986; FRIBERG, 1971; KLEIN, 2002). Segundo Klein (2002) a orientação dos cristais líquidos é adequada para fornecer viscosidade elevada ao redor das gotículas de óleo, mas não forte suficiente para evitar o fluxo, assim, são típicos líquidos viscosos. Os álcoois graxos, como *álcool cetoestearílico*, espessam emulsões pela formação de estrutura em gel que prolonga-se da superfície das gotículas para a fase externa. Isso aumenta a viscosidade e impede o movimento das gotículas.

A reologia da fase lamelar cristalina líquida tem sido estudada numa ampla faixa de sistema incluindo tensoativos não-iônicos. Uma grande quantidade de pesquisa tem focalizado no entendimento das mudanças na microestrutura da fase lamelar sob cisalhamento. Muitos dos trabalhos da década de 80 focalizaram os efeitos da concentração nas propriedades reológicas da fase lamelar. Estes estudos da dependência da concentração com a reologia da fase lamelar também têm induzido a tentativas de esclarecimento das transições microestruturais em diferentes concentrações de tensoativos. Embora haja forte dependência da reologia da fase lamelar com a concentração de tensoativo, algumas características da fase lamelar são independentes da natureza do sistema de tensoativos escolhido (BERNI *et al.*, 2002).

Deste modo, nesse estudo a viscosidade mostrou-se dependente do tipo e da concentração do tensoativo, sendo essencial na estabilidade do sistema e no desenvolvimento de emulsões, pois pode dificultar a instabilidade física, tais como cremeação e floculação, entre outros, devido resistência física oferecida pelo meio (AZZINI, 1999; DAHMS, 1991).

Sendo selecionada a formulação, conforme o valor de EHL requerido (9,0) e a formação de cristais líquidos, cuja composição é formada por 10,0% do sistema de óleos e 10,0% do sistema tensoativo composto por mistura de *Ceteareth 5* e *Steareth 2*, utilizou-se o diagrama de fases com o objetivo de otimizar a seleção da formulação para dar continuidade ao estudo, levando em consideração a estabilidade, obtenção de fase líquidas cristalinas e compatibilidade cutânea. Desse modo, para este estudo selecionou-se uma região do diagrama ao redor da formulação anteriormente escolhida.

Dentro do campo da cosmetologia, estudos de sistemas ternários têm sido usados primeiramente para obter diferentes formas cosméticas utilizando um único sistema óleo-tensoativo-água e para melhorar a compreensão de várias características físico-químicas. O

diagrama auxilia na determinação da natureza do produto resultante para cada mistura (FERRARI *et al.*, 2003).

Todas as formulações B10, C1, B11, C3, C4, C5, C6, C7 (**Tabela 5**) foram submetidas ao teste de centrifugação, uma vez que apresentaram estabilidade macroscópica. Apresentaram aparência semelhante macroscopicamente, ou seja, estáveis, com coloração amarelo alaranjada opaca, com odor forte característico do óleo de melaleuca e baixa consistência. Após serem submetidas aos três ciclos do teste de centrifugação, as emulsões mostraram o mesmo comportamento, não ocorreu separação de fases permanecendo estáveis, exceto as formulações C1, C5, C6 e C7, que tiveram a concentração de fase oleosa elevada ou de tensoativo diminuída, apresentaram uma tênue camada oleosa na superfície após o último ciclo da centrifugação, indicativa de instabilidade (**Tabela 16**).

A análise microscópica das amostras representativas da região do diagrama ternário revelou que as formulações apresentaram formação de glóbulos homogêneos, exceto as formulações C5 e C6, que tiveram a concentração de tensoativo diminuída (**Figuras 14- 17**). Com microscopia de polarização foi possível observar e identificar a presença de cristais líquidos do tipo lamelar em todas as formulações (**Figuras 14- 19**). Entretanto, as formulações C5, C6 e C7 apresentaram formação de fase cristalina líquida lamelar consideravelmente menor.

Estas formulações apresentaram balanço entre fase oleosa/tensoativo/fase aquosa inadequado para a formação de mesofases lamelares, pois segundo Tyle (1989) a interação óleo/tensoativo/água proporciona a formação de cristais líquidos ao redor dos glóbulos da emulsão aumentando a estabilidade.

A interação fraca entre óleo, água e o emulsificante origina uma terceira fase que forma multicamadas ao redor das gotículas da emulsão (fase líquida cristalina na interface), causando aumento na estabilidade da emulsão. Estas multicamadas atuam como barreira

reológica contra a coalescência (BRINON *et al.*, 1998; DAHMS, 1986; KLEIN, 2002; NESSEEM, 2001; TYLE, 1989).

A estrutura lamelar na fase líquida cristalina consiste de camadas hidrofóbicas e hidrofílicas, que contém elevada quantidade de água entre as cadeias hidrofílicas (PARK *et al.*, 2001). Dessa maneira, pode-se dizer que a formação dessas fases mesomórficas foi influenciada pela interação, tipo e concentração das substâncias anfifílicas (tensoativos) com o solvente, água e fase oleosa.

A formulação B11, que continha elevada concentração de fase oleosa e de tensoativo, apresentou maior formação de cristal líquido lamelar. Entretanto, de acordo com este estudo a formulação B10 foi a mais adequada para os propósitos desta pesquisa e realização dos demais testes, visto que esta apresentou considerável formação de cristais líquidos numa maior concentração de fase oleosa vegetal e menor concentração de tensoativos, o que proporciona grande vantagem em termos de compatibilidade com a pele, aplicabilidade e efeito desejado do produto. Pois, segundo Schueller & Romanowski (1998) os compostos oleosos apresentam numerosos benefícios para a pele, como emoliência, maciez e hidratação.

O estudo do diagrama ternário água/tensoativo/óleo revelam muitas possibilidades de acordo com os diferentes estados de agregação molecular presentes em equilíbrio. Os domínios da solubilidade podem corresponder a regiões como as de estruturas de cristal líquido e apresentam um amplo espectro de possibilidades disponíveis simplesmente variando a proporção relativa dos componentes do sistema (COMELLES *et al.*, 1989). Este sistema possibilita preparar misturas de água/tensoativo/óleo e determinar a natureza do produto resultante de cada mistura, bem como destacar o conhecimento das concentrações ideais entre os constituintes de uma determinada forma e formulação, ou seja, auxilia na determinação da concentração máxima e mínima limite para uma formulação estável e balanceada (COMELLES *et al.*, 1989; FERRARI *et al.*, 2003; FERRARI, 1998).

Ferrari *et al.* (2003) desenvolveram emulsões contendo óleos vegetais (andiroba ou copaíba) e mistura de tensoativos, lecitina de soja e éster fosfórico. O emprego do diagrama de fases no desenvolvimento proporcionou a obtenção em todos os sistemas ternários de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar e mediano.

O modo como uma emulsão é preparada afeta as características finais e consequentemente a aceitação pelo consumidor (SIMOVIC *et al.*, 1999). Os procedimentos de manipulação, como energia de agitação, nível de dispersão, tempo de homogeneização e temperatura de preparação, podem influenciar as características e a estabilidade da emulsão (ECCLESTON, 1990; REALDON *et al.*, 2002).

A técnica de inversão de fases é útil no desenvolvimento de emulsões com tamanho de partículas reduzido, sendo este um parâmetro importante nas características do produto final, como estabilidade (KLEIN, 2002). A velocidade de agitação é uma outra condição que pode influenciar no tamanho e homogeneidade das partículas, bem como na estabilidade e características do produto final (REALDON *et al.*, 2002; SANCTIS, 1999; SILVA & SOARES, 1996).

Com a finalidade de verificação da velocidade de agitação mais adequada para o preparo da emulsão, a emulsão B10, constituída por sistema de óleos, composto pelos três óleos: urucum, café e melaleuca e por 10,0% de tensoativos, *Ceteareth 5* e *Seareth 2* com valor de EHL 9,0, foi novamente desenvolvida. Assim, as emulsões B10a, B10b, B10c, B10d e B10e diferiram entre si somente quanto à velocidade de agitação durante o preparo.

A velocidade de agitação influenciou aspectos tanto macroscópico quanto microscópico, embora todas foram estáveis ao serem submetidas aos três ciclos do teste de centrifugação (**Tabela 17**). Foi possível observar macroscopicamente que com o aumento da velocidade de agitação as emulsões tornaram-se gradativamente mais aeradas, sendo observado também na análise microscópica. Apenas as emulsões desenvolvidas com 300

(B10a) e 600 rpm (B10b) não apresentaram formação de bolhas de ar. A aeração proveniente de excesso de agitação confere aspecto negativo com relação à aparência da emulsão (SANCTIS, 1999).

A análise microscópica (**Figuras 20 a 23**) também mostrou que o tamanho dos glóbulos diminuiu com o aumento da velocidade de agitação, e sob luz polarizada foi possível identificar a presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar nas formulações, exceto na formulação B10e. As formulações B10a e B10b apresentaram maior formação dessa fase mesomórfica, que foram diminuídas nas demais formulações.

Pode-se dizer que com o aumento da velocidade de agitação durante o preparo, as fases cristalinas lamelares diminuem, chegando à ausência na formulação preparada com velocidade de agitação de 1500 rpm.

Eccleston (1990) descreve que variações no processo afetam a estrutura e propriedades das emulsões. A agitação influencia a distribuição dos tensoativos dentro da fase fundida e bicamadas, estando relacionada aos mecanismos de arranjo lamelar dentro do sistema.

As mesmas amostras foram novamente avaliadas microscopicamente após análise reológica, não apresentando qualquer alteração quanto aos aspectos microscópicos em função do cisalhamento sofrido, mostrando-se estáveis nessa faixa de cisalhamento por tal período de tempo.

A velocidade de agitação não alterou o comportamento reológico das formulações, pois mostrou o mesmo perfil das análises reológicas anteriores, mantendo em todas as amostras o comportamento pseudoplástico e tixotropia, que pode ser avaliado através dos reogramas obtidos (**Figuras 24 e 25**) e dos valores de índice de fluxo (η) (**Tabela 18**). Entretanto, com o aumento da velocidade de agitação durante o preparo das emulsões observou-se aumento do índice de consistência, viscosidade (**Tabela 18**), que reflete a

propriedade do material resistir a alterações permanentes na sua forma (ALCANTARA & DIAS, 1998).

O aumento da velocidade de agitação ou da concentração de tensoativo diminui o tamanho das partículas da fase oleosa e assim aumenta a viscosidade da emulsão, bem como sua estabilidade (KLEIN, 1984; KNOWLTON & PEARCE, 1996). Segundo Sanctis (1999) o aumento da viscosidade aparente da emulsão pode ser também devido à incorporação de ar proveniente de excesso de agitação.

Comparando-se as formulações B10a e B10b verifica-se o maior e o menor valor de índice de fluxo, respectivamente, o que leva a acreditar que a formulação B10b apresenta comportamento pseudoplástico mais acentuado.

Os valores de viscosidade das formulações diminuíram em função do aumento da taxa de cisalhamento ocorrendo o inverso quando está é diminuída, porém os valores iniciais de viscosidade não foram recuperados imediatamente, apresentando assim, área de histerese (**Figura 25**). A tixotropia é identificada pela presença da área de histerese nos reogramas, formada pelas curvas ascendente e descendente (ALMEIDA & BAHIA, 2003; GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003).

Esse comportamento pseudoplástico e tixotrópico, característico de emulsões O/A, é vantajoso e desejado em termos de aplicação, pois de acordo com Gaspar & Maia Campos (2003), este tipo de formulação pode romper facilitando o espalhamento, e o filme aplicado à pele poderá recuperar viscosidade instantaneamente.

Estas formulações foram ainda submetidas ao teste de determinação dos valores de densidade e gravidade específica, pois a medida de densidade pode ser relacionada ao controle de aeração do produto (SANCTIS, 1999). Observou-se que os valores de densidade e gravidade específica diminuíram em função do aumento da velocidade de agitação (**Tabela**

19), com diminuição considerável para as formulações B10d e B10e indicando a incorporação de ar nessas formulações preparadas com excesso de agitação (SANCTIS, 1999).

Segundo a equação de Stokes, a velocidade de sedimentação é diretamente proporcional ao tamanho das partículas na fase interna, portanto, a redução dos tamanhos das gotículas é de grande importância para a manutenção da estabilidade física do sistema emulsionado. Porém, nem sempre a redução das dimensões das partículas resulta em maior estabilidade do sistema, sendo também importante a uniformidade de distribuição do tamanho das partículas. Assim, o tamanho das gotículas não é fator absoluto na melhora da estabilidade de uma emulsão, sendo também importantes a reologia e a homogeneidade de distribuição das gotículas da fase interna. O aumento da viscosidade da fase externa pode também aumentar a estabilidade da emulsão, pois pode dificultar (devido à resistência física oferecida pelo meio-emulsão) os fenômenos físicos de instabilidade (presença de sedimentação, cristalização, cremação, floculação e coalescência) diminuindo a velocidade de sedimentação (KNOWLTON & PEARCE, 1996; PRISTA, 1981; SILVA & SOARES, 1996).

Assim, como o intuito era o de selecionar a velocidade de agitação mais adequada para o preparo das emulsões a serem desenvolvidas e avaliadas quanto aos demais testes desta pesquisa, determinou-se que a velocidade de agitação mais adequada neste caso é a de 600 rpm (B10b), considerando todos os parâmetros e análises realizadas, ou seja, menores tamanhos e uniformidade das partículas de óleo, ausência de aeração, comportamento pseudoplástico mais acentuado e formação de cristal líquido.

A formulação B10 foi selecionada para incorporar a cafeína. No entanto, devido à dificuldade de manter essa substância solúvel na formulação B10, outras foram desenvolvidas alterando a concentração do ativo e tensoativo, adicionando umectantes em diferentes concentrações e solubilizando a cafeína com auxílio do benzoato de sódio.

Essas formulações desenvolvidas (**Tabela 6**) apresentaram-se macroscopicamente estáveis, bem como após serem submetidas aos três ciclos da centrifugação (**Tabela 20**), porém na análise microscópica observou-se a presença de cristais de cafeína nas emulsões D1, D2, D3 e D4. Com a adição de benzoato de sódio foi possível solubilizar a cafeína, que foi confirmado pela análise microscópica, visto que nas formulações D5, D6, D7, D8, D9 e D10 não se evidenciaram cristais de cafeína (**Tabela 20**).

Como a cafeína foi incorporada à fase aquosa, utilizou-se o benzoato de sódio para elevar sua solubilidade nas formulações, seguindo a mesma orientação que é realizada para injetáveis aquosos, onde a proporção entre cafeína e benzoato de sódio deve ser 1:1 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975). Tano (2003) que também empregou benzoato de sódio na proporção 1:1, evidenciou o auxílio deste na solubilização da cafeína.

Através de microscopia de polarização foram identificadas fases líquidas cristalinas do tipo lamelar e/ou estriado em todas as formulações em diferentes graus de formação. A adição de umectante auxiliou na solubilização da cafeína, porém diminuiu a formação de cristal líquido do tipo lamelar, enquanto que o aumento da concentração de tensoativo solubilizou o ativo, bem como aumentou a formação de cristal líquido lamelar.

Segundo os parâmetros analisados a emulsão D6 foi selecionada, pois além de não observar cafeína cristalizada mostrou maior formação de fases mesomórficas do tipo lamelar.

Os cristais líquidos lamelares são preferidos para propósitos tópicos porque são frequentemente menos viscosos do que os cristais líquidos do tipo hexagonal ou cúbico (ENGELS & RYBINSKI, 1998). Segundo Lochhead *et al.* (1986), essa fase lamelar é a mais importante de todas as fases líquidas cristalinas para estabilidade das emulsões, apresentando comportamento pseudoplástico.

Essa formulação foi ainda avaliada quanto ao processo de incorporação da cafeína, principalmente sobre a influência na formação de fases mesomórficas, assim as formulações D6a, D6b, D6c e D6d foram desenvolvidas diferindo apenas quanto à incorporação do ativo.

Todas as formulações mostraram-se estáveis tanto na análise macroscópica quanto no teste de centrifugação e sem recristalização da cafeína através de microscopia (**Tabela 21**). Observou-se presença de áreas de anisotropia indicando a formação de cristais líquidos em todas as emulsões. Na emulsão D6b (ativo adicionado durante a emulsificação) foi identificado cristal líquido do tipo lamelar estriado, ao passo que nas demais também foram identificadas fases líquidas cristalinas do tipo lamelar liso, porém na emulsão D6d ocorreu maior formação de cristais líquidos lamelares (**Tabela 21**).

Como emulsões utilizando tensoativos nao-iônicos contendo fases líquidas cristalinas lamelares apresentam um tempo para estruturação e obtenção de equilíbrio entre água livre e estruturada (ECCLESTON & BEATTIE, 1989; NESSEEM, 2001) e de acordo com Rieger (1996), durante o desenvolvimento da preparação, esta pode não ter tido oportunidade de equilibrar-se plenamente podendo ocorrer mudanças na área interfacial, na distribuição do emulsificante e no endurecimento dos constituintes sólidos, sendo necessário um período inicial de espera, assim o processo mais adequado para a adição do ativo foi após 24 horas, pois a emulsão se encontrava estruturada e a incorporação do ativo não alterou de forma significativa a sua estruturação, mantendo a mesofase lamelar.

6.2. Testes de estabilidade físico-química das emulsões O/A

Emulsões recém-preparadas não devem ser submetidas a testes de estabilidade, seja pela exposição imediata a condições de tensão ou a procedimentos de teste, pois durante seu desenvolvimento pode não ter tido oportunidade de equilibrar-se plenamente, o que pode ser

explicado quando se considera a instabilidade intrínseca das emulsões, ou seja, a dispersão pode não ter adquirido estabilidade logo após o preparo. É desejável um período inicial de espera para que haja a estabilização, sendo usualmente aceito 24 a 48 horas após o preparo (DI MAMBRO, 2001; MASSON, 2005; RIEGER, 1996).

Assim, as emulsões **B11** e **D6d** (**Tabela 22**) previamente selecionadas para dar continuidade ao estudo foram submetidas aos Testes de Estabilidade Preliminares, ou seja, avaliadas quanto à análise macroscópica e microscópica, centrifugação, determinação dos valores de pH e condutividade, estresse térmico, vinte e quatro horas após a manipulação.

Para a rápida avaliação da estabilidade da emulsão, as condições de tensão mais utilizadas são a centrifugação e a temperatura (BURY *et al.*, 1995; RIEGER, 1996; SANCTIS, 1999).

O teste preliminar de centrifugação é uma ferramenta que nos permite avaliar, em um curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físicas e químicas que possam atingir as formulações. Quando a emulsão é submetida à centrifugação, a separação de fases pode ocorrer devido à cremação ou coalescência. A lei de Stokes, que descreve a velocidade de sedimentação das gotículas sendo diretamente proporcional ao tamanho destas na fase interna, mostra que a cremação é função da gravidade e que um aumento na gravidade acelera a separação (DI MAMBRO, 2001; IDSON, 1993b; SILVA & SOARES, 1996).

Dessa forma, neste teste pode-se constatar rapidamente a separação das fases da dispersão avaliando a coalescência ou cremação exibidas pelas formulações (AZZINI, 1999; CADWALLADER, 1989; IDSON, 1993b; SILVA & SOARES, 1996). É de grande interesse já que possibilita informação muito rápida e comparável sobre as propriedades de estabilidade de diferentes emulsões (WITTERN *et al.*, 1985).

A centrifugação com forças moderadas, como as que são geradas a 2.000 a 5000 rpm, durante curto período em várias temperaturas, podem ser extremamente proveitosas (IDSON, 1993b; RIEGER, 1996).

A temperatura é importante na estabilidade do produto cosmético por razões práticas, uma vez que nenhum produto pode ser isolado do seu meio ambiente, a influência de fatores como variação de temperatura não pode ser ignorada em qualquer avaliação de estocagem (CADWALLADER, 1989; SANCTIS, 1999). Neste estudo utilizou-se o teste de estresse térmico proposto por Braconi *et al.* (1995), que emprega a temperatura como condição de tensão sobre a formulação e pode ser considerado um teste de realização rápida.

Ferrari (1998) e Rieger (1996) sugerem que emulsões podem ser adicionalmente testadas por qualquer técnica química ou física. Dessa forma, as formulações foram submetidas à análise microscópica e determinação dos valores de pH e condutividade. Através de microscopia é possível observar características da formulação, como glóbulos e homogeneidade da emulsão, e com auxílio de luz polarizada, observar a presença de áreas de anisotropia (cristais líquidos com birrefringência) e identificar as fases mesomórficas (AZZINI, 1999; FERRARI, 2002; FERRARI, 1998).

A determinação da condutividade elétrica das formulações é uma técnica muito utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa, visto que esta é dependente da natureza da fase externa da formulação (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998; LATREILLE & PAQUIN, 1990). Através desse método é possível avaliar a variação no conteúdo de água livre do sistema emulsionado e, desta maneira, identificar mudanças estruturais que possam ocorrer (KORHONEN *et al.*, 2002; MASSON, 2005).

A determinação dos valores de pH, outro teste freqüentemente realizado para monitorar a estabilidade de emulsões, fornece informações sobre a integridade das fases da

emulsão sugerindo que uma alteração do mesmo pode indicar uma decomposição química dos componentes presentes na formulação e/ou permite ajustá-lo ao pH ótimo de ação de componentes presentes na formulação (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

Apresenta importância também quanto aos aspectos dermatológicos, pois as emulsões podem ser ajustadas a um pH semelhante ao da pele com o objetivo de manter seu equilíbrio, desde que este tamponamento não influencie nas propriedades terapêuticas desta emulsão.

Segundo análise macroscópica, essas emulsões mantiveram a estabilidade, coloração amarelo alaranjada opaca, odor forte característico do óleo de melaleuca e baixa consistência, sendo então submetidas aos demais testes. As emulsões mostraram-se sem qualquer alteração durante os ciclos da centrifugação a que foram submetidas, apresentando-se estáveis (**Tabela 23**).

Porém, no teste de estresse térmico estas emulsões apresentaram separação de fases nas temperaturas entre 70 e 75 °C, mantendo estabilidade em temperaturas inferiores a esta (**Tabela 24**). Entretanto, esses sinais de instabilidade não são considerados nesse estudo, uma vez que 70°C é a temperatura de fusão das matérias-primas para o preparo de formulação, ou seja, a temperatura de homogeneização.

Rieger (1996) relata que as mudanças de homogeneidade podem ser encaradas como instabilidade da emulsão, principalmente se as condições de temperatura e centrifugação não forem excessivamente tensionantes. Porém, é bem estabelecido que muitas emulsões podem ser perfeitamente estáveis a 40-45 °C, mas não podem tolerar temperaturas em excesso de 55 ou 60 °C mesmo em curto período, sendo irrelevante nas temperaturas de 75-85 °C (CADWALLADER, 1989; IDSON, 1993b).

Dessa forma, outros parâmetros importantes na estabilidade como os valores de pH e condutividade foram determinados apenas antes do estresse térmico (**Tabela 23**), e nesse caso seriam comparativos antes e após o estresse térmico, porém essa comparação não foi possível

devido à separação de fases apresentada, inviabilizando a continuidade do teste e às análises posteriores ao estresse térmico.

A análise microscópica, realizada também apenas antes do estresse térmico, mostrou que as emulsões mantiveram as características esperadas devido aos testes de microscopia anteriores. Foi possível observar homogeneidade dos glóbulos e, com auxílio de luz polarizada, identificar presença de fase líquida cristalina do tipo lamelar em todas as emulsões (**Figuras 26 e 27**).

Durante o desenvolvimento do produto cosmético, após a definição da formulação, torna-se difícil para o formulador aguardar dois a três anos de estocagem para determinar o prazo de validade do produto. Dessa forma os testes de estocagem tornam-se uma ferramenta útil (SANCTIS, 1999).

Essas emulsões analisadas pelos testes preliminares de estabilidade foram submetidas aos Testes de Estabilidade Acelerada. Normalmente, para a realização destes testes empregam-se condições agressivas de temperatura. Knowlton & Pearce (1996) sugere que as emulsões sejam armazenadas à temperatura ambiente (20-25 °C), altas temperaturas (40°C), baixas temperaturas (1-5°C) e ciclo gela/degela (-10/ 37 ou 40°C – 5 ou 6 ciclos). Klein (1984) propõe armazenamento à temperatura ambiente (25 °C), estufa (37 e 50°C), geladeira (4°C), congelador (-10°C) e ciclo gela/degela (-10/ 25 °C – 5 ciclos). Idson (1993b) também sugere armazenamento à temperatura ambiente (25 °C), estufa (37 e 45 ou 50°C), geladeira (-10 ou 4°C) e ciclo gela/degela (-20/ 50 °C – 3 ou 4 ciclos, ou mais moderado, 4/45 °C – 6 ciclos). Essas condições extremas aceleram os processos de envelhecimento e instabilidade, reduzindo o tempo para avaliação da estabilidade, evidenciando possíveis instabilidades, físicas e químicas (FERRARI, 1998; IDSON, 1993a; LATREILLE & PAQUIN, 1990; MASSON, 2005).

As amostras submetidas às várias temperaturas (4, 25 e 45 °C) durante 30 dias, foram avaliadas macroscopicamente durante a realização do teste (TEA). Estas permaneceram com coloração amarelo alaranjada opaca, odor forte característico do óleo de melaleuca e estáveis, apresentando apenas visualmente gotículas de fase oleosa na superfície quando submetidas após 15 dias à temperatura de $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Estufa), porém não apresentaram sinais de instabilidade após os ciclos da centrifugação (**Tabela 25**).

O monitoramento da estabilidade através da determinação dos valores de pH e de condutividade elétrica revelou que as formulações mantiveram-se estáveis durante o período de estudo, exceto a formulação B11 quando submetida à 45°C (estufa), que apresentou diminuição dos seus valores de pH indicando sinais de instabilidade a temperaturas elevadas (**Tabela 26**).

Entretanto, apresentaram valores de pH compatível com o pH cutâneo, que se apresenta levemente ácido (4,5- 6), (ECCLESTON, 1997; LEONARDI, 2000; PEYREFITTE, 1998), pois quando aplicamos à pele algum produto que possua valor de pH diferente, alteramos as condições fisiológicas desse órgão, expondo-o a uma situação adversa (AZZINI, 1999).

A adição de cafeína não alterou o valor do pH da emulsão base, entretanto aumentou consideravelmente os valores de condutividade elétrica, que pode indicar aumento de água livre na fase externa da emulsão provavelmente decorrente de sua necessidade para solubilização da substância ativa, bem como aumento de carga iônica aumentando a condução da corrente elétrica. Porém, não se observou nenhuma alteração na consistência ou aparência da emulsão, permanecendo a fase externa hidrofílica, ou seja, não ocorreu inversão de fases.

Masson (2005) quando avaliou a condutividade elétrica de emulsões O/A contendo cristal líquido observou diminuições dos seus valores, sugerindo que seja decorrente de aumento de água estruturada e diminuição de água livre.

Os aspectos microscópicos não foram alterados durante o teste, visto que para as duas emulsões o tamanho e homogeneidade dos glóbulos mostraram-se inalterados, bem como as estruturas líquidas cristalinas lamelares permaneceram nas diferentes condições durante o período de estudo (**Figuras 30 e 31**). Embora, a formulação D6d após 30 dias na temperatura de 45°C (estufa) apresentou também a formação de mesofase estriada (**Figura 31**).

De acordo com os parâmetros analisados, as formulações B11 e D6d apresentaram estáveis, pois segundo Sanctis (1999) uma emulsão estável é aquela que mantém a qualidade de fase oleosa dispersa na fase contínua, ou vice-versa, mesmo quando é submetida a tensões decorrentes de temperatura, agitação e gravidade.

6.3. Avaliação da liberação da cafeína *in vitro*

A cafeína é uma substância ativa que vem sendo muito empregada em formulações tópicas para atenuação da celulite (CHORILLI, 2004). Neste estudo procurou-se determinar a disponibilidade da cafeína a partir de emulsão O/A através da avaliação da liberação *in vitro* (RANGEL, 1998).

Com este intuito procedeu-se a construção da curva de calibração da cafeína. Para tanto, selecionou-se primeiramente o melhor comprimento de onda para a quantificação da cafeína, que foi em 273 nm (**Figura 32**). Em seguida, construiu-se a curva de calibração da cafeína em solução tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (**Figura 33**), que apresentou linearidade nas concentrações analisadas e um bom coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9993$).

O passo seguinte foi verificar a solubilidade da cafeína no meio receptor utilizado. A cafeína apresentou solubilidade de 19,86 mg/ml em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, que está próximo aos da literatura consultada, segundo a qual apresenta solubilidade de cerca de 23,86 mg/ml em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (CHORILLI, 2004), 19,64 mg/ml

em tampão fosfato isotônico pH 7,4 (CLÉMENT *et al.*, 2000) e em água cerca de 21,88 mg/ml (AKOMEAH *et al.*, 2004).

Através da diálise traçou-se o perfil de liberação da cafeína a partir das formulações B11c e formulação D6d (**Figura 34** e **Figura 36**) plotando valores de quantidade de ativo liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) obtidos em função do tempo, que mostra para ambas as formulações a liberação gradual da cafeína no período de experimento (12 horas), porém continuou aumentando indicando que a substância ainda estava sendo liberada. Pelas **Figuras 34** e **36** observou-se que o perfil de liberação apresentou duas fases: uma primeira fase de liberação inicial rápida, de até 5 horas com fluxo (J) de $83,271 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação B11c e 4 horas com J de $21,595 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para D6d, seguida de outra fase mais lenta, até 12 horas com J de $33,347$ e $5,3915 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para as formulações B11c e D6d, respectivamente.

A partir da regressão linear nas duas fases do perfil de liberação foram obtidos os coeficientes de correlação (r^2) para as duas formulações. Pela **Tabela 30** observa-se que todos foram maiores que 0,9, indicando assim a linearidade da liberação na primeira e segunda fase.

Dentre os parâmetros cinéticos de liberação da cafeína das formulações envolvidas no estudo, o fluxo (J) é um dos mais importantes (CHORILLI, 2004). A **Tabela 30** apresenta os valores de J para as formulações. Comparando-se as duas formulações, observou-se que na formulação D6d os fluxos na primeira e segunda fase da liberação foram menores (**Tabela 30**), bem como a quantidade de cafeína liberada foi consideravelmente menor quando comparada à B11c (**Figura 38**), assim pode-se dizer que o benzoato de sódio está influenciando na sua liberação, provavelmente por interação com a cafeína.

Entretanto, segundo Tano (2003), apesar do benzoato de sódio facilitar a solubilização da cafeína não existem pesquisas sobre a interação entre estes dois componentes, e que tipo de alteração na penetração, permeação e absorção pela pele, o que ocorre é o aumento da

solubilidade da cafeína na fase aquosa, o coeficiente de partição O/A também é alterado e provavelmente irá influenciar em sua passagem pela pele.

Observa-se que esse perfil de liberação não foi linear (**Figuras 34, 36 e 38**), ao passo que quando plotou-se valores de quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelo $\sqrt{\text{tempo}}$ (pseudo 1ª ordem) (**Figuras 35 e 37**), a curva obtida foi linear com bom coeficiente de correlação linear ($r^2 = 0,989$ para cafeína e $r^2 = 0,9641$ para cafeína + benzoato de sódio).

Esses resultados estão de acordo com Chorilli (2004) e Clément *et al.* (2000), que obtiveram perfis semelhantes para a liberação *in vitro* da cafeína.

Segundo Rangel (1998), emulsão com cafeína na fase aquosa estudada estaria se comportando como se aprisionasse o ativo, pois apresentou menores valores de absorbância quando comparado ao creme base incorporado de cafeína e creme contendo cafeína na fase oleosa.

Doucet *et al.* (1998) compararam a liberação da cafeína a partir de emulsão simples O/A e múltipla A/O/A utilizando célula de Franz e membrana de celulose num período de 6 horas. Neste estudo relatam que a liberação a partir da emulsão múltipla foi mais lenta, visto que menor quantidade de cafeína foi encontrada na fase receptora.

Clément *et al.* (2000) quando estudaram a liberação da cafeína usando célula de Franz e membrana de celulose concluíram que a liberação *in vitro* dessa substância é influenciada pela natureza do emulsificante, sendo o tensoativo não-iônico mais eficiente do que tensoativo de silicone.

Chorilli (2004) avaliou a liberação da cafeína a partir de lipossomas, obtendo como resultado uma liberação retardada da cafeína encapsulada por efeito dos lipossomas, evidenciando também que o fato dos lipossomas estarem presentes em gel propiciou um fluxo menor da substância ativa pela membrana.

Segundo Tyle (1989), os cristais líquidos são usados na tecnologia de liberação controlada, pois previnem a liberação rápida de substância dissolvida na fase líquida dispersa das emulsões. Este efeito é devido à estrutura multilamelar do cristal líquido ao redor das gotículas, que reduz o transporte interfacial da substância dissolvida dentro das gotículas. Entretanto, relata estudos utilizando substâncias hidrossolúveis que se localizam nas regiões aquosas do cristal líquido lamelar, evitando a difusão da fase aquosa externa. A taxa de difusão diminui devido a um aumento das barreiras interfaciais criado por aumento na formação de estruturas líquidas cristalinas.

Porém, a análise através de espectrofotômetro para quantificar a cafeína não possibilita sua separação do benzoato de sódio. Assim utilizou-se uma outra metodologia, eletroforese capilar, que mostrou-se adequada para tais propósitos.

Eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação usada para análise de substâncias, fornecendo vantagens em termos de simplicidade; alta eficiência de separação; baixo consumo de solvente e amostra; baixo custo, pois não usa colunas, bombas e gradiente de fase móvel; bem como um método rápido, apresentando extensa faixa de aplicações em análises farmacêutica e biomédica (KOWALSKI *et al.*, 2005; SOMBRA *et al.*, 2005; SUNTORNSUK, 2002). A separação é obtida por migração diferencial dos solutos num campo elétrico. A migração das substâncias é devido à migração eletroforética e fluxo eletroosmótico (EOF), que é resultado da carga da parede interna do capilar durante a aplicação de um campo elétrico. (SUNTORNSUK, 2002).

Usada para separação de diferentes compostos de fontes naturais, incluindo cafeína (ISSAQ, 2000). De acordo com Pomponio *et al.* (2003) na análise de substâncias do chá verde como cafeína a eletroforese capilar (CE) tem tornado-se uma alternativa efetiva devido sua versatilidade em análises simultâneas de uma ampla faixa de compostos farmacêuticos com propriedades físicas e químicas variadas, e separação de alta resolução, bem como uma

ferramenta analítica bem estabelecida e madura no campo farmacêutico. As altas eficiências de separação obtidas neste método são bem adequadas para misturas complexas (OKAMOTO *et al.*, 2005).

Para isso foi necessário avaliar a solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0 utilizado como meio receptor e solvente na eletroforese capilar. Inicialmente realizou-se varredura do espectro UV utilizando o mesmo tampão, obtendo-se 273 nm como melhor comprimento de onda para a quantificação da cafeína (**Figura 39**). Assim, procedeu-se a construção da curva de calibração em tampão borato pH 10,0 (**Figura 40**), que apresentou linearidade nas concentrações analisadas e ótimo coeficiente de correlação ($r^2 = 1$).

Através da equação da reta, obtida pela análise de regressão linear da curva de calibração, foi possível determinar a solubilidade da cafeína em tampão borato pH 10,0, que foi de 17,415 mg/ml, próximo àquele encontrado para o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5.

Visando avaliar a disponibilidade da cafeína a partir da formulação F1 (**Tabela 7**) realizou-se liberação *in vitro* através do método de sistema de membrana em multicamadas (“*multilayer membrane system*”). A quantificação do ativo foi efetuada através da eletroforese capilar (CE), assim inicialmente construiu-se a curva de calibração da cafeína e do benzoato de sódio por esse mesmo método (**Figuras 41 e 42**, respectivamente). As curvas apresentaram linearidade nas concentrações analisadas e um bom coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9846$ e $0,9726$).

A análise da eletroforese capilar (CE) mostrou 2 picos para a amostra extraída da célula 7- membrana 2 e 1 pico para a amostra extraída da célula 8- membrana 2. A amostra da célula 7- membrana 2 apresentou pico para cafeína e benzoato de sódio, e da célula 8- membrana 2 apresentou pico apenas para benzoato de sódio, que através da equação da reta obtida pela curva de calibração construída pela eletroforese capilar (CE) foram calculadas,

obtendo-se 36,24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cafeína e 22,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de benzoato de sódio liberada após 1 hora (Tabela 31).

Dessa forma, essa metodologia utilizada para analisar cafeína + benzoato foi adequada, pois as substâncias foram separadas com tempo de migração 3,74 min e 11,57 min para cafeína e benzoato de sódio, respectivamente (APÊNDICE D).

A separação e determinação de cafeína e benzoato de sódio são complicadas devido suas similaridades em algumas propriedades. A espectroscopia ultravioleta tem sido usada para determinar estes compostos, entretanto o uso de eletroforese capilar em análises farmacêuticas pode apresentar benefícios. A versatilidade da eletroforese capilar (CE) em análises de amplo espectro de substâncias farmacêuticamente relevantes variam em polaridade, tamanho e estereoquímica. As elevadas eficiências obtida na eletroforese capilar (CE) são bem adequadas para misturas complexas na qual a resolução de um grande número de picos num tempo curto de análises é desejada (GOMEZ *et al.*, 2002).

A separação e caracterização da cafeína e vários de seus metabólitos tem sido previamente relatados numa ampla faixa de matrizes, usando uma variedade de técnicas e condições experimentais, incluindo vários modos de eletroforese capilar (CE) (PERI-OKONNY *et al.*, 2005). Boyce (2001) relata que utilizando um método de eletroforese capilar (CE) para separação e análise de ácido benzóico e cafeína usando tampão fosfato no pH 11 obteve a separação dos componentes em cerca de 10 minutos, estando de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho.

Assim, a eletroforese capilar (CE) foi eficiente e apropriada técnica com intuito de avaliar a cafeína e benzoato de sódio juntos, uma vez que apresentaram eficiente separação com tempo de migração diferente entre eles, embora o perfil de liberação a partir da formulação não foi determinado.

Neste trabalho, sugere-se que a presença de mesofase lamelar estaria retardando a liberação, visto que as formulações contendo cristal líquido lamelar (B11c e D6d) apresentaram perfil de liberação em duas fases com liberação lenta, como obtido por Doucet *et al.* (1998) com emulsões múltiplas e Chorilli (2004) com lipossomas, enquanto a liberação de cafeína a partir de solução, segundo Chorilli (2004), apresenta perfil de liberação em apenas uma fase com fluxo elevado.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais, pode-se concluir que:

- Obteve-se emulsão O/A, contendo óleo de urucum, de café e de melaleuca como fase oleosa, estável com valor de EHL 9,0 e concentração de 15,0% de mistura de tensoativos (*Oleth 3* e *Oleth 20*).
- A substituição da mistura de tensoativos por *Ceteareth 5* e/ ou *Steareth 2* propiciou a formação de cristais líquidos identificados como lamelares.
- Todas as formulações apresentaram fluxo não-Newtoniano pseudoplástico e tixotropia.
- A formulação B11 (15,0% de *Ceteareth 5* e *Steareth 2*) foi selecionada para se efetuar a adição da substância ativa.
- As formulações B11 e D6d apresentaram-se estáveis, homogêneas, com coloração amarelo alaranjada opaca, odor forte característico do óleo de melaleuca e baixa consistência. Não foi observada nenhuma alteração na consistência ou aparência da emulsão.
- A adição de cafeína e benzoato de sódio na proporção 1:1 aumentou os valores de condutividade da emulsão base (B11), podendo indicar aumento de água livre na fase externa da emulsão. Entretanto, as formulações permaneceram com fase externa hidrofílica, sem ocorrência de inversão de fases.
- A formulação B11 apresentou diminuição dos valores de pH quando submetida à 45°C (estufa) indicando sinais de instabilidade a temperaturas elevadas. Ambas formulações apresentaram valores de pH compatível com o pH cutâneo.
- A adição de cafeína não alterou o valor do pH da emulsão base.

- As formulações D6d e B11c apresentaram perfil de liberação gradual da cafeína no período de experimento.
- O perfil de liberação foi linear em duas fases: uma primeira fase de liberação inicial rápida e outra fase mais lenta.
- A adição de benzoato de sódio apresentou influência no estudo de liberação *in vitro* observada pela diminuição nos fluxos e quantidade de cafeína liberada.
- A presença de cristais líquidos lamelares provavelmente retardou a liberação da cafeína.
- A eletroforese capilar mostrou-se mais adequada para análise da cafeína juntamente com benzoato de sódio.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOMEAH, F.; NAZIR, T.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 337-345, 2004.

ALCANTARA, M.R.; DIAS, L.C.F. The cholesterization process on lyotropic liquid crystals studied by rheology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 136, p. 155-158, 1998.

ALI, A.A.; MULLEY, B.A. Formation of liquid crystal and other non-fluid phases in emulsions containing non-ionic surfactants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 30, p. 205-213, 1978.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v. 15, n. 3, p. 96-100, 2003.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. In: _____. **Farmacotécnica – formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**, São Paulo: Premier, 2000, p. 397-438.

ANSMANN, A.; BAUMOLLER, G.; KOESTER, J.; PRAT, E.; TESMANN, H.; WADLE, R. Emulsões cosméticas tipo o/a para novas aplicações. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 54-57, 1996.

* De acordo com:

Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Universidade de São Paulo, 2004.

AZZINI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo, 1999. 169p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

AYANNIDES, C.A.; KTISTIS, G.G. Stability estimation of emulsions of isopropyl myristate in mixtures of water and glycerol. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, p. 165-173, 2002.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v.12, n. 2, p. 44-50, 2000.

BERACA – catálogo de matéria-prima (Óleo de urucum e Óleo de melaleuca).

BERNI, M.G.; LAWRENCE, C.J.; MACHIN, D. A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems. **Advances in Colloid and Interface science**, v. 98, p. 217-243, 2002.

BERTIN, C.; ZUNINO, H.; PITTET, J-C.; BEAU, P.; PINEAU, P.; MASSONNEAU, M. ; ROBERT, C.; HOPKINS, J. A double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinol, caffeine, and ruscogenine by a combination of several non-invasive methods. **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, n. 4, p. 199- 210, 2001.

BEVAQUA, A.J.; LAHANAS, K.M.; COHEN, I.D.; CIOCA, G. Liquid Crystals in Multiple Emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v.106, n. 5, p. 53-56, 1991.

BOYCE, M. C. Determination of additives in food by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1447-1459, 2001.

BRACONI, F.L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M.N.F.; ROCHA FILHO, P.A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12, 1995, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995, p. 6-19.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; TRANCHANT, J-F.; POUGET, T.; COUARRAZE, G. Influence of lamellar liquid crystal structure on percutaneous diffusion of hydrophilic tracer from emulsions. **Journal of Cosmetic Science**, v. 49, p. 1-11, 1998.

BURY, M.; GERHARDS, J.; ERNI, W.; STAMM, A. Application of a new method based on conductivity measurements to determine the creaming stability of O/W emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p 183-194, 1995.

CADWALLADER, D.E. Stability Testing – Its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 104, n. 11, p. 87-102, 1989.

CATEC, CÂMARA TÉCNICA DE COSMÉTICOS. Utilização de metilxantinas em preparações cosméticas. Parecer Técnico n.º 01/01 de 29/06/01

CHANDLER, M. Tecnologia água-em-óleo. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v. 14, n. 6, p. 46-52, 2002.

CHEMYUNION – catálogo de matéria-prima (Melscreen® Coffee).

CHIEN, Y.W. Fundamentals of Rate-Controlled Drug Delivery. In:_____. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992, v. 50, p. 43-137.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cafeína veiculados em géis hidrofílicos: estudos de estabilidade e liberação *in vitro***. 2004. 149p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid Crystal and Cosmetic Applications. **Cosmetics & Toiletries**, v.105, n. 5, p. 57-62, 1990.

CLÉMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J-P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 243-254, 2000.

COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J. ; PARRA, J.L. ; COLL, J.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 11, p. 5-19, 1989.

COMO SE DESENVOLVE A CELULITE. HTML. 2005. Disponível em <<http://www.celluliteexpert.com/portuguese/howdoes.html>>. Acesso em: 10 dez. 2005.

COSMETIC BENCH REFERENCE. **Cosmetics & Toiletries**, p. 2.45, 2.46, 2.94, 2.118, 2.165, 2.180, 2.190, 2.203, 2.233, 1996.

COULTER DELSA 440 SX[®] Manual do Aparelho, Junho, 1998.

CRODA – catálogo de matéria-prima (Volpo[®] 03 e Volpo[®] 20).

CTFA – Cosmetic Ingredient Handbook. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. 1ª Edição, p. 121, 147, 149, 281, 282, 397, 410, 1988.

CURRI, S. B. Cellulite and Fatty Tissue Microcirculation. **Cosmetics & Toiletries**, v. 108, n. 4- 6, p. 51-58, 1993.

DAHMS, G. Viscosity regulation by surfactants. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 13, p. 43-50, 1991.

DAHMS, G. Properties of O/W emulsions with anisotropic lamellar phases. **Cosmetics & Toiletries**, v. 101, n. 11, 113-115, 1986.

DELONCA, H.; ALVARADO, D.; SAUNAL, H.; PASSET, J.; LAGET, J.P. Emulsification des huiles végétales: application à l'huile d'olive. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 4, p. 83-98, 1982.

DIFERENÇA ENTRE HOMEM E MULHER. HTML. 2005. Disponível em <<http://www.celluliteexpert.com/portuguese/anatomy.html>>. Acesso em: 10 dez. 2005.

DI MAMBRO, V.M. **Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase: avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática**. 2001. 138p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

DI SALVO, R.M. Controlando o Surgimento da Celulite. **Cosmetics & Toiletries**, (ed. Port.), v. 8, n. 4, p. 56-62, 1996.

DMA 4500/5000[®] Manual do Aparelho, Anton Paar, Áustria, 2000.

DOUCET, O.; FERRERO, L.; GARCIA, N.; ZASTROW, L. O/W emulsion and W/O/W multiple emulsion: physical characterization and skin pharmacokinetic comparison in the delivery process of caffeine. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 283-295, 1998.

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

ECCLESTON, G.M. Multiple-phase oil-in-water emulsions. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 41, p. 1-22, 1990.

ECCLESTON, G.M.; BEATTIE, L. Microstructural changes during the storage of systems containing cetostearyl alcohol/polyoxyethylene alkyl ether surfactants. In: RUBINSTEIN, M.H. **Pharmaceutical Technology: drug stability**. New York: John Wiley & Sons, 1989, p. 76-87.

ENGELS, T.; RYBINSKI, W.V. Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1313-1320, 1998.

ELY MARTINS – catálogo de matéria-prima (Álcool cetoestearílico).

FERRARI, M.; MONTEIRO, L.C.L.; NETZ, D.J.A.; ROCHA-FILHO, P.A. Identifying cosmetic forms and crystalline phases from ternary systems. **Cosmetics & Toiletries**, v. 118, n. 8, p. 61-70, 2003.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*)**. 2002. 142p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba**. 1998. 147p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FOX, C. Rationale for the selection of emulsifying agents. **Cosmetics & Toiletries**, v. 101, n. 11, p. 25- 44, 1986.

FRIBERG, S. Liquid crystalline phases in emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 37, n. 2, 1971.

FROEBE, C.L.; SIMION, A.; OHLMEYER, H.; RHEIN, L.D.; MATTAI, J.; CAGAN, R.H.; FRIBERG, S.E. Prevention of stratum corneum lipid-phase transitions in vitro by glycerol – an alternative mechanism for skin moisturization. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 41, p. 51-65 jan/fev, 1990.

GAO, T.; TIEN, J-M.; CHOI, Y-H. Sunscreen formulas with multilayer lamella structure. **Cosmetics & Toiletries**, v. 118, n. 10, p. 41-52, 2003.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GOLIK, V. Tudo o que você precisa saber para vencer a celulite e ficar de bem com o seu corpo. São Paulo: Senac, 1995, p. 15-18.

GOMEZ, M. R.; OLSINA, R. A.; MARTÍNEZ, L. D.; SILVA, M. F. Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 791-799, 2002.

ISSAQ, H. J. A decade of capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1921-1939, 2000.

IDSON, B. Stability testing of emulsions, I. **Drug & Cosmetics Industry**, v. 151, n. 1, p. 27-28, 30, 1993a.

_____. Stability testing of emulsions, II. **Drug & Cosmetics Industry**, v. 151, n. 2, p. 38, 40, 42-43, 72, 1993b.

IWAI, H.; FUKASAWA, J.; SUZUKI, T. A liquid crystal application in skin care cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 87-102, 1998.

KLEIN, K. Liquid crystal and emulsions: a wonderful marriage. **Cosmetics & Toiletries**, v. 117, n. 5, p. 30-34, 2002.

_____. Improving emulsion stability. **Cosmetics & Toiletries**, v. 99, n. 3, p. 121-126, 1984.

KNOWLTON, J.; PEARCE, S. Emulsions. In:_____. **Handbook of cosmetic science and technology**. Oxford: Cotswold Publishing Company, 1996, p. 95-118.

_____. Skin and skin products. In:_____. **Handbook of cosmetic science and technology**. Oxford: Cotswold Publishing Company, 1993, p. 167-200.

KORHONEN, M.; LEHTONEN, J.; HELLEN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 247, p. 103-114, 2002.

KORHONEN, M.; HELLEN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations – effect of storage time and conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 187-296, 2001.

KOWALSKI, P.; KONIECZNA, L.; CHMIELEWSKA, A.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 983-989, 2005.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1666-1668, 1990.

LESSER, T.; RITVO, E.; MOY, L.S. Modification of Subcutaneous Adipose Tissue by a Metilxantine Formulation: A Double-Blind Controlled Study. **Dermatology Surgery**, v. 25, n. 6, p. 455-462, 1999.

LEONARDI, G.R. In:_____. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004, p. 13-31, 105-129, 167-186.

LEONARDI, G.R. **Avaliação da estabilidade e efeito no conteúdo aquoso do estrato córneo de formulações cosméticas contendo, ou não, vitaminas A ou E ou ceramida III**. 2000. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

LOCHHEAD, R.Y. Emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v. 109, n. 5, p. 93-103, 1994.

LOCHHEAD, R.Y.; HEMKER, W.J.; CASTAÑEDA, J.Y. Novel Cosmetic Emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v. 101, n. 6, p. 125-138, 1986.

MARTINDALE, The Extra Pharmacopeia, 31 ed., London: Pharmaceutical Press, 1996, p. 1652- 1654, 1724.

MARUNO, M. **Avaliação da hidratação cutânea a partir de emulsões simples e/ou complexas contendo proteína**. 1998. 139p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

MASSARO, R.C.; ZABAGLI, M.S.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; DEL LAMA, D.S.; ROCHA-FILHO, P.A. O/W dispersions development containing liquid crystals. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, anno 142, n. 7, p. 264-270, 2003.

MASSON, D.S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes**. 2005. 163p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MASSON, D.S.; MORAIS, G.G.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; SANTOS, O.D.H.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Polyhydroxy alcohols an peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463-468, 2005.

MORAIS, G.G.; SANTOS, O.D.H.; MASSON, D.S.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, p. 591-596, 2005.

MORAIS, G.G.; MASSON, D.S.; ROCHA-FILHO, P.A.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Stability estimation of emulsions in mixtures of self emulsifying base and humectants. **Brazilian Journal pf Pharmaceutical Sciences**, v. 39, suppl. 2, p. 101, 2003.

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 387-399, 2001.

NEUBERT, R.; BENDAS, C.; WOHLRAB, W.; GIENAU, B.; FÜRST, W. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 75, p. 89-94, 1991.

OKAMOTO, H.; NAKAJIMA, T.; ITO, Y.; AKETO, T.; SHIMADA, K.; YAMATO, S. Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 517-528, 2005.

OMOTOSHO, J. A.; WHATELEY, T. L.; FLORENCE, A. T. Methotrexate transport from internal phase of multiple W/O/W emulsion. **Journal of microencapsulation**, v. 6, p. 183-192, 1989.

OXITENO – catálogo de matéria-prima (Unitol[®] CE 50 e Unitol[®] E 20), 2004.

PARK, B.D.; KIM, Y.; LEE, M.; YOUM, J.K.; JEONG, S.; CHOI, E.H.; LEE, S.H. Properties of a pseudoceramide multilamellar emulsion *in vitro* and *in vivo*. **Cosmetics & Toiletries**, v. 116, n. 6, p. 65-76, 2001.

PERI-OKONNY, U. L.; WANG, S. X.; STUBBS, R. J.; GUZMAN, N. A. Determination of caffeine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2652-2663, 2005.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral e Biologia da Pele**. São Paulo: Editora Andrei Ltda., 1998, p. 39-43, 325-328.

PHARMASPECIAL. Guia de Aplicação de Produtos, 1998.

POMPONIO, R.; GOTTI, R.; LUPPI, B.; CAVRINI, V. Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of green tea catechins: effect of the surfactant on the separation selectivity. *Electrophoresis*, v. 24, p. 1658-1667, 2003.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. In:_____. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981, v. 1, p. 179-210 e 1125-81.

QUERLEUX, B.; CORNILLON, C.; JOLIVET, O.; BITTOUN, J. Anatomy and physiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy: relationships with the sex and presence of cellulite. **Skin Research and Technology**, v. 8, p. 118- 124, 2002.

RANGEL, V.L.B.I. **Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas**. 1998. 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

REALDON, N.; PERIN, F.; MORPURGO, M.; RAGAZZI, E. Influence of processing conditions in the manufacture of O/W creams: I. Effect on dispersion grade and rheological characteristics. **II Farmaco**, v. 57, p. 341-347, 2002.

RIBEIRO, H.M. Teorias de estabilidade de emulsões cosméticas. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v. 14, n. 4, p. 88-92, 2002.

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

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 47-53, set/out 1996.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Lipídeos. In:_____. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**, São Paulo: Editorial Premier, 1997, p. 71- 89.

ROSEMBAUM, M.; PRIETO, V.; HELLMER, J.; BOSCHMANN, M.; KRUEGER, J.; LEIBEL, R.L.; SHIP, A.G. An Exploratory Investigation of the Morphology and Biochemistry of Cellulite. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 7, p. 1934-1939, 1998.

SANCTIS, D.S. Emulsões para uso externo. **Revista Racine**, v. 53, p. 53-63, novembro/dezembro, 1999.

SANTOS, O.D.H.; MIOTTO, J.V.; MORAIS, J.M.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 243-249, 2005.

SCHUELLER, R; ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. **Cosmetics & Toietries**, v. 113, n. 9, p. 39-44, 1998.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toietries** (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 37-46, 1996.

SIMOVIC, S.; MILIC-ASKRABIC, J.; VULETA, G.; IBRIC, S.; STUPAR, M. The influence of processing variables on performance of O/W emulsion gels based on polymeric emulsifier (Pemulen®TR-2NF). **International Journal of Cosmetic Science**, v. 21, p. 119-125, 1999.

SMITH, W.P. Cellulite treatments: snake oils or skin science. **Cosmetics & Toiletries**, v. 110, n. 7, p. 61- 68, 1995.

SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L. D.; SILVA, M. F. Comprative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in “guarana” based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.

SUNTORNUSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical susbtances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 679-698, 2002.

TAMBURIC, S. The aging of polymer-stabilized creams: a rheological viewpoint. **Cosmetics & Toiletries**, v. 115, n. 10, p. 43-49, 2000.

TANO, C.T.N. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação da cafeína e Cafeisilane®** C. 2003. 143p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

THE MERCK INDEX: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th ed. New Jersey: Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, 2001, p. 114, 275, 431, 1361, 1622, 8726.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishers, 1989, p. 125-162.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), XIX ed. Easton: Mack Printing Company, 1975, p. 59, 570.

VIGLIOGLIA, P.A. In:_____. **Cosmiatria II**, Buenos Aires: Americana de Publicaciones SA, 1989, p. 303-313.

WITTERN, K.P.; ANSMANN, A.; HUTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.; KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SEIB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G. Stability testing of cosmetic emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v. 100, n. 10, p. 33-39, 1985.

9. Apêndices

APÊNDICE A – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) *versus* absorbância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de solução de benzoato de sódio a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5.

APÊNDICE B – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) *versus* absorbância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de benzoato de sódio a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ em tampão borato pH 10,0.

APÊNDICE C – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) versus absorbância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de cafeína + benzoato de sódio a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ em tampão borato pH 10,0.

APÊNDICE D – Separação da cafeína e do benzoato de sódio utilizando tampão borato pH 10,0 através de eletroforese capilar (CE), com os respectivos tempo de migração.

APÊNDICE E – Todas as formulações avaliadas no presente trabalho e relacionadas com o objetivo do seu desenvolvimento.