UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética

José Fernando Topan

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: José Fernando Topan

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 16/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Topan, José Fernando.

Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética / José Fernando Topan; orientador: Pedro Alves da Rocha Filho – Ribeirão Preto; 2012.

94p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

1. Emulsões e Cristais Líquidos.
2. Óleo de Girassol.
3. Antioxidante.
4. Ésteres. Graxos.
5. Hidratação da pele.

FOLHA DE APROVAÇÃO

TOPAN, José Fernando

Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus
pais, José Aparecido Topan e
Sônia Maria Gênova Topan,
pelo amor, apoio e incentivo
para alcançar meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela presença constante.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** – USP, pela valiosa oportunidade de aprimoramento profissional.

À Prof^a. Dr^a. **Lúcia Helena Faccioli**, por abrir as portas da universidade e de seu laboratório (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) para realização de aprimoramento e pela minha indicação de aluno de pós-graduação para o Professor Pedro.

Ao meu querido amigo Prof. Dr. **Pedro Alves da Rocha Filho**, pelo carinho e acolhimento em seu laboratório, pela oportunidade de estágio e consequentemente o mestrado, pela constante orientação e paciência no desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

A agência de fomento **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) no período de Setembro de 2009 a Julho de 2010.

A agência de fomento **FAPESP** (Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo – Processo: 2009/04584-1) no período de Agosto de 2010 à Setembro de 2011. Obrigado pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Aos Prof^{es}. Dr^{es}. **Juliana Maldonado Marchetti, Marilisa Guimarães Lara e Wanderley Pereira de Oliveira**, pelas sugestões valiosas dadas no Exame de Qualificação do presente trabalho.

Aos Prof^{es}. Dr^a. **Maria José Vieira Fonseca** e Dr. **Luis Alexandre Pedro de Freitas**, por terem aberto as portas de seu laboratório para realização dos estudos *in vitro* da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH• e estudos comportamento reológico, respectivamente.

Aos amigos e colegas de laboratório: **Cindy Hana Okuma, Daniela Spuri Bernardi, Érika Cristina Vargas de Oliveira, Gisely Spósito Vieira, Josiane Bortoloto, Juliana Caetano da Silva Prado, Mônica Maruno, Naira Rezende Maciel, Talita Anunciato Pizza, Tatiana Pereira e Viviane Gumiero** pela boa convivência, discussões e momentos de descontração. Agradecimento especial à doutoranda **Naira**, pela ajuda constante nos momentos de dúvidas e à **Cindy, Gisely e Josiane** pela companhia e amizade dentro e fora do ambiente de trabalho.

As empresas **Lipo do Brasil** e **Croda**, que gentilmente doaram as matérias-primas utilizadas no desenvolvimento dessa pesquisa

Ao técnico **Manoel Eduardo Bortolin** pelo apoio e auxílio no dia-a-dia.

Aos meus pais, **José Aparecido Topan** e **Sônia Maria Gênova Topan**, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, pelo incentivo e por tudo que me proporcionaram na minha vida.

A minha irmã, **Keli Cristiane Topan** e meu cunhado **Eduardo Siqueira Vasques**, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus amigos **Eduardo Ramos**, **Marcelo Cavalcanti** e **Débora Piai Diniz** pelo companheirismo no dia a dia, por se tornarem parte da minha família.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

TOPAN, J. F. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética.** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Emulsões são sistemas dispersos constituídos de pelo menos duas fases líquidas imiscíveis e um agente emulsificante para estabilização das mesmas. A fase dispersa destes sistemas é conhecida como fase interna e o meio dispersante como fase externa, porém, são sistemas termodinamicamente instáveis. A presença de cristais líquidos aumenta a estabilidade destas dispersões e além de alterar a viscosidade. São capazes de promover o encapsulamento de ativos, permitindo liberação sustentada, bem como a proteção dos fármacos foto- e termo-sensíveis. O óleo de girassol é uma interessante fase oleosa em uma emulsão, pois possui propriedades cicatrizantes devido à alta concentração de ácido linoléico e propriedades antioxidantes devido à presença de polifenóis e vitamina E. Possuem aplicações em diferentes áreas como: cosméticos, alimentos, veículos de medicamentos e outros. Assim, os objetivos deste estudo foram desenvolver emulsões estáveis contendo cristais líquidos a partir da mistura de óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) e mineral (vaselina líquida), caracterizá-las e avaliar a influência de diferentes ésteres graxos na formação dos cristais líquidos. As formulações foram desenvolvidas utilizando o método de diagrama e pseudo-diagrama ternário, a partir dos quais foram selecionadas duas formulações que demonstraram se estáveis e apresentaram cristais líquidos durante todo o teste de estabilidade acelerada. As mesmas foram aditivadas com extrato glicólico de polifenóis e ésteres graxos e permaneceram estáveis com cristal líquido. A caracterização reológica observou-se fluxo pseudo-plástico e tixotrópico, ideal para produtos farmacêuticos e cosméticos. O óleo de girassol apresentou atividade antioxidante mesmo quando aquecidos para o processo de emulsificação pelo método do radical DPPH[•]. As cadeias carbônicas dos ésteres graxos utilizados em produtos cosméticos podem influenciar na formação e manutenção dos cristais líquidos. Por meio dos testes *in vivo* observou-se que as formulações desenvolvidas promoveram aumento prolongado da hidratação da pele e não foram observados sinais de irritação cutânea.

Palavras-chave: Emulsões e Cristais Líquidos; Óleo de Girassol; Antioxidante; Ésteres. Graxos; Hidratação da pele.

ABSTRACT

TOPAN, J. F. **Emulsion composed by sunflower oil (*Helianthus annus* L.) with liquid crystals: evaluation of physical-chemical properties and cosmetic activity.** 2012. 94 pages. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Emulsions are dispersed systems consisting of at least two immiscible liquid phases and an emulsifying agent to stabilize them. The dispersed phase of these systems is known as the internal phase and the dispersing environ is the external phase, which are, however, thermodynamically unstable systems. The presence of liquid crystals increases the stability of these dispersions and also change the viscosity. They are able to promote the encapsulation of active, allowing sustained release as well as the protection of photo-and thermo-sensitive drugs. Sunflower oil is an interesting phase in an oily emulsion, because it has healing properties due to the high concentration of linoleic acid, and antioxidant properties due to the presence of polyphenols and vitamin E. They have applications in different areas such as cosmetics, food, medicines and other vehicles. The objectives of this study were to develop stable emulsions containing liquid crystals from a mixture of sunflower oil (*Helianthus annus* L.) and mineral (mineral oil), characterize them and evaluate the influence of different fatty esters in the formation of liquid crystals. The formulations were developed using the method of diagram and ternary pseudo-diagram, from which we selected two formulations that have been demonstrated stable and presented as liquid crystals throughout the accelerated stability test. They were doped with polyphenols glycolic extracts and acid esters, and have been kept stable with liquid crystal. At the rheological characterization was observed pseudo-plastic flow and thixotropic, ideal for pharmaceuticals and cosmetics. Sunflower oil showed antioxidant activity even when heated to the emulsification process by the radical DPPH• method. The carbon chains of fatty esters used in cosmetics can influence the formation and maintenance of liquid crystals. In vivo tests showed that the formulations developed promoted prolonged increase in skin hydration and were not seen signs of skin irritation.

Keywords: Emulsions and Liquid Crystals, Sunflower Oil, Antioxidant, Fatty Esters, Skin Hydration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação histológica das camadas da pele (epiderme e derme) e da camada subcutânea, a hipoderme	5
Figura 2	Estágios da diferenciação da epiderme	6
Figura 3	Representação histológica da pele, ilustrando os tipos de pele e os receptores	9
Figura 4	Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões	14
Figura 5	Esquema representando a transição de cristal líquido para fase gel lamelar de acordo com a temperatura de transição	17
Figura 6	Óleo de girassol	19
Figura 7	Ação do radical livre na célula	21
Figura 8	Estrutura química do alquil benzoato	27
Figura 9	Estrutura química do lactato de cetila	27
Figura 10	Estrutura química do palmitato de cetila	28
Figura 11	Estrutura química do caprílico triglicerídeos	28
Figura 12	Estrutura química do lactato laurico	28

Figura 13	Estrutura química do éster cetílico	28
Figura 14	Estrutura química do estearato de octila	29
Figura 15	Estrutura química do miristato de isopropila	29
Figura 16	Estrutura química do palmitato etoxílico	29
Figura 17	Estrutura química do PPG-3 miristato éter benzílico	29
Figura 18	Regiões do antebraço demarcadas para avaliação <i>in vivo</i>	35
Figura 19	Princípio de medida do Sebumeter®	37
Figura 20	Representação das coordenadas $L^*a^*b^*$ definida pela Comissão Internacional de Iluminação	38
Figura 21	Diagrama ternário, pontos (21,27,28,34,35,35) em destaque utilizados para obtenção das emulsões	40
Figura 22	Diagrama Pseudo-Ternário (Formulações ao redor do ponto 36)	42
Figura 23	Detalhamento das concentrações de tensoativos de 0,5% em 0,5% no diagrama pseudo-ternário	43
Figura 24	Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada das formulações após 24 horas de preparo	44
Figura 25	Valores de pH das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada	47
Figura 26	Valores de pH das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada	47

Figura 27	Valores de condutividade elétrica das formulações 6,5 e 7,0 durante o teste de estabilidade acelerada	48
Figura 28	Valores de condutividade elétrica das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada	48
Figura 29	Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 6,5 sem aditivação em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias	50
Figura 30	Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 7,0 sem aditivação em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias	50
Figura 31	Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 6,5 aditivada com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias	51
Figura 32	Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias	51
Figura 33	Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação em diversas condições de armazenamento	53
Figura 34	Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% extrato glicólico de polifenóis de girassol	54
Figura 35	Índice de consistência das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada	55
Figura 36	Índice de consistência das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada	56
Figura 37	Índice de fluxo das formulações 6,5 e 7,0 não aditivadas durante o teste de estabilidade acelerada	56

Figura 38	Índice de fluxo das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada	57
Figura 39	Tixotropia das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada	57
Figura 40	Tixotropia das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada	57
Figura 41	(A) radical difenilpicrilhidrazila e (B) molécula difenilpicrilhidrazina	58
Figura 42	Determinação da medida a atividade doadora de H^+ do óleo de girassol ao DPPH [•]	59
Figura 43	Medida a atividade doadora de H^+ do óleo de girassol aquecido $75 \pm 2^\circ C$ ao DPPH [•]	60
Figura 44	Valores de pH das formulações aditivadas com 1% éster durante o teste de estabilidade acelerada	62
Figura 45	Condutividade elétrica das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada	63
Figura 46	Fotomicrografias (200X) sob luz polarizada das formulações aditivadas com 1% de éster (1- miristato de isopropila, 2- lactato de cetila, 3 – caprilicos triglicerídeos, 4 – éster cetílico, 5 – estearato de octila, 6 – palmitato de cetila) armazenadas em diferentes condições de armazenamentos durante o teste de estabilidade acelerada	64
Figura 47	Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações aditivadas com 1% de éster graxos em diversas condições de armazenamento	66
Figura 48	Índice de consistência das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada	67
Figura 49	Índice de fluxo das formulações aditivadas com 1% éster durante o teste de estabilidade acelerada	68

Figura 50	Tixotropia das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada	69
Figura 51	Gráfico do resultado da avaliação do potencial hidratante das formulações.	70
Figura 52	Gráfico do resultado da avaliação da oleosidade cutânea das formulações.	71
Figura 53	Gráfico do resultado da avaliação dos valores de pH cutâneo das formulações	72
Figura 54	Gráfico do resultado da avaliação irritação cutâneo (a*) das formulações	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do <i>Natural Moisturizing Factor</i> (NMF)	11
Tabela 2	Parâmetros usados para elaboração das curvas, ascendente e descendente, de gradiente de cisalhamento e viscosidade.	33
Tabela 3	Concentrações da mistura dos óleos de girassol e mineral	41
Tabela 4	Concentrações da mistura dos tensoativos aniônico e não iônico	41
Tabela 5	Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O1T1	41
Tabela 6	Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas através do diagrama ternário	41
Tabela 7	Detalhamento das concentrações (%) de tensoativos, óleos e água	42
Tabela 8	Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas através do diagrama pseudo-ternário	42
Tabela 9	Detalhamento das concentrações (%) de tensoativos, óleos e água.	44
Tabela 10	Resultados do teste de estabilidade preliminar	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/O = Água em Óleo

DP = Desvio Padrão

DPPH[•] = Radical *diphenylpicrylhydrazil*

HR = Hidratação Relativa

IM = Intensamente Modificada

INCI = *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

LM = Levemente Modificada

M = Modificada

Mc = Média da capacitância das leituras da região controle das áreas de aplicação do produto

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

N = Normal

NMF = *Natural Moisturizing Factor*

O/A = Óleo em Água

rpm = rotação por minuto

TEWL = *TransEpidermal Water Loss*

Tt = Temperatura de transição

UV = Ultravioleta

v = volume

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A pele.....	5
2.1.1 Epiderme.....	6
2.1.2 Derme.....	8
2.1.3 Hipoderme.....	9
2.1.4 Funções da pele.....	9
2.1.5 A pele e produtos cosméticos.....	11
2.2 Emulsões.....	12
2.2.1 Processo de instabilidade física de emulsões.....	13
2.2.2 Cristais líquidos e estruturas lamelares em fase gel.....	15
2.3 Comportamento reológico.....	18
2.4 Óleo de girassol.....	19
2.5 Radicais livres e Antioxidantes.....	20
2.6 Ésteres graxos.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	24

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Material.....	26
4.1.1 Óleos.....	26
4.1.2 Bases auto-emulsionantes.....	26
4.1.3 Aditivos.....	27
4.1.3.1 Ésteres graxos.....	27
4.1.3.2 Ativo.....	30
4.1.4 Conservante.....	30
4.1.5 Equipamentos.....	30
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Desenvolvimento da emulsão.....	31
4.2.1.1 Obtenção da emulsão.....	31
4.2.1.2 Determinação das concentrações de óleo-água-tensoativos.....	31
4.2.2 Análise macroscópica das formulações.....	31
4.2.3 Análise microscópica das formulações.....	31
4.2.4 Testes preliminares de estabilidade da emulsão.....	32
4.2.4.1 Teste de centrifugação.....	32
4.2.4.2 Estresse térmico.....	32
4.2.5 Determinação do valor de pH.....	32
4.2.6 Determinação da condutividade elétrica.....	33
4.2.7 Teste de estabilidade acelerada.....	33
4.2.8 Estudo da viscosidade e propriedades reológicas da emulsão.....	33
4.2.9 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	34
4.2.10 Avaliação <i>in vivo</i> das emulsões.....	34
4.2.10.1 Avaliação da hidratação cutânea.....	36
4.2.10.2 Avaliação da oleosidade cutânea.....	36
4.2.10.3 Avaliação do valor de pH cutâneo.....	37

4.2.10.4 Avaliação do potencial irritante	37
4.2.11 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Determinação das concentrações de fases oleosa/aquosa/tensoativo.....	40
5.2 Estabilidade preliminar	45
5.3 Estabilidade acelerada.....	46
5.3.1 Valores de pH	46
5.3.2 Condutividade elétrica	48
5.3.3 Análise microscópica sob luz polarizada	49
5.4 Propriedades reológicas	51
5.5 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	58
5.6 Influência da adição de ésteres graxos na formação e manutenção dos cristais líquidos	61
5.6.1 Valores de pH	62
5.6.2 Condutividade elétrica	63
5.6.3 Análise microscópica sob luz polarizada	64
5.6.4 Comportamento reológico.....	65
5.7 Avaliação <i>in vivo</i> do potencial hidratante, oleosidade, pH cutâneo e irritação.....	70
5.7.1 Avaliação do potencial hidratante.....	70
5.7.2 Avaliação da oleosidade cutânea	71
5.7.3 Avaliação dos valores de pH cutâneo	72
5.7.4 Avaliação do potencial irritante	73
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE A.....	89

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A pele, maior órgão do corpo humano, desempenha três funções principais: transmissão de estímulos e sensações, regulação da temperatura corporal e proteção. Além de barreira física contra agressões externas, protege contra a desidratação excessiva devido à presença de uma mistura de lipídeos (colesterol, ácidos graxos livres) e suor denominada manto hidrolipídico presente sobre a epiderme. Ainda compõem este manto aminoácidos livres, uréia e ácido lático, conhecido como *Natural Moisturing Factor* (NMF) (BOWSERT et al., 1994).

A combinação entre o desejo consumidor e o desenvolvimento das novas tecnologias cosmética e farmacêutica e proporcionou o surgimento de novos sistemas com propriedades específicas e capazes de veicular ativos com perfil diferenciado de liberação que otimizada com a aplicação de diferentes áreas. As preparações emulsionadas cosméticas para o cuidado da pele constituem um grupo particular no qual diferenciam-se as emulsões contendo cristais líquidos, emulsões múltiplas e nanoemulsões (ANDRADE, 2008).

Crems hidratantes na forma de emulsões consistem na mistura de dois líquidos imiscíveis onde um líquido está disperso em outro na forma de pequenos glóbulos. A formação da emulsão é possível devido à ação do emulsificante, que forma uma camada estabilizadora ao redor dos glóbulos do líquido disperso, impedindo a coalescência (BOOK, 2007).

Alguns sistemas emulsionados mais complexos proporcionaram a extensão da definição de emulsões para incluir o termo: dispersões de cristais líquidos (SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006).

Os cristais líquidos são sistemas que podem ser encontrados em muitas emulsões, sendo facilmente detectado através de microscopia, sob luz polarizada devido à propriedade de birrefringência (FRIBERG *et al.*, 1987). Possuem diversas aplicações tanto em formulações cosméticas quanto farmacêuticas. Em função da microestrutura, são capazes de promover o encapsulamento de ativos, permitindo a liberação sustentada dos mesmos, bem como, a proteção de fármacos, foto e termossensíveis, promoção do aumento de retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea, além de aumentar a estabilidade destes sistemas ao diminuir a coalescência e alterar a viscosidade (MASSON *et al.*, 2005).

A biodiversidade brasileira apresenta multiplicidade de matérias primas com grande potencial para aplicações tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica/ cosmética.

Alguns óleos vegetais apresentam glicerol e ésteres graxos em sua composição além de vitaminas, que aumentam a hidratação da pele através da oclusividade e mantêm a pele hidratada com aspecto brilhante (SANTOS, 2011).

O óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) como fase oleosa contém vários tipos de ácidos graxos: saturados monoinsaturado e poliinsaturados (PEDERSEN, 2000). Na cosmetologia, esta sendo utilizado em sabonetes, cremes, hidratantes e produtos de limpeza da pele. Além disso, o óleo de girassol é muito utilizado na preparação de emulsões cosméticas também por conter em sua composição vitamina E (RAHETE *et al.*, 2007). A vitamina E é muito importante nos produtos cosméticos devido à propriedade antioxidante (THIELE, 2007). Os polifenóis de girassol são potentes antioxidantes devido à inativação dos radicais livres (VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998).

Radicais livres são originados por reações de redução de oxigênio e podem causar uma série de danos celulares, como inativação de enzimas, alteração do estado óxido redução intracelular e alterações do DNA, ocorrendo morte celular. O processo de envelhecimento cutâneo está associado ao crescente desequilíbrio entre produção e destruição de radicais livres. Uma forma de amenizar a ação dos radicais livres é o uso de vitaminas E, C e A, selênio e zinco (STEINER, 2006).

Para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos é importante o efeito sobre a hidratação da pele. Métodos não invasivos são utilizados para avaliar a eficácia de novos produtos sendo a hidratação mensurada pela medida da capacitância elétrica que envolve a aplicação de uma corrente elétrica de baixa frequência e intensidade no estrato córneo. São realizadas várias medidas comparativas em determinadas regiões do corpo com e sem a aplicação do produto cosmético com a finalidade de avaliar o efeito hidratante (PEREIRA, 2011).

Tendo em vista as pesquisas recentes sobre sistemas emulsionados contendo cristais líquidos em produtos cosméticos e farmacêuticos, devido à capacidade das estruturas lamelares aumentarem a hidratação relativa da pele e auxiliar na estabilidade do sistema, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver emulsões contendo cristais líquidos, utilizando o óleo de girassol com fase oleosa, devido às propriedades antioxidantes. Foram avaliados aspectos físico-químicos das formulações, caracterização dos cristais líquidos, comportamento reológico, atividade antioxidante e capacidade *in vivo* do potencial hidratante e irritante das formulações.

REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pele

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

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

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

2.1.1 Epiderme

Constituída de várias camadas formadas pelo queratinócitos a epiderme consiste de uma estrutura complexa (Figura 2), as células epiteliais estratificadas que sofrem diferenciação à medida que se deslocam da camada basal para superfície da pele. Em um

sistema dinâmico essas camadas estão em constante renovação, desde sua junção com a derme até a superfície cutânea, onde ocorre descamação permanente de numerosas camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas, chamadas de corneócitos. Para que todo esse evento ocorra são necessários aproximadamente 30 dias (LEONARDI, 2004; RIBEIRO, 2006)

As camadas que formam a epiderme são denominadas (do meio externo para o interno) como: córnea, granulosa, espinhosa e basal, uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre as camadas córnea e granulosa na palma das mãos e na sola dos pés (ANDRADE, 2008).

Figura 2: Representação histológica dos estágios da diferenciação da epiderme (Fonte: SEGRE, 2006)

Descrevemos a seguir algumas características destas diferentes camadas:

- camada basal: é a mais interna da epiderme, sendo constituída por células que se dividem continuamente, dando origem às demais que compõem a epiderme. Nesta camada ainda encontram-se os melanócitos, células responsáveis pela síntese de melanina, substância, responsável pela coloração, proteção solar natural, e ainda, as células de Langherans desempenhando papel fundamental no sistema imunológico da pele (RIBEIRO, 2010).

- camada espinhosa: situa-se acima da camada basal sendo conhecida também como camada Malphigiana, formada por várias fileiras de células, sendo as mais profundas poliédricas e as superiores achatadas. As células são ligadas entre si por pontes intercelulares denominadas desmossomas (RIBEIRO, 2010).

- camada granulosa: situa-se entre a camada espinhosa e a córnea, tendo a espessura de duas ou três camadas de células. Esta região da epiderme é responsável pela formação da bicamada de lipídios presente entre as fileiras de células corneificadas que formam a camada córnea tendo como função, prevenir a desidratação das camadas subjacentes da epiderme, formar barreira e oferecer resistência à absorção percutânea, atuando também como cimento ao fixar as células queratinizadas umas às outras, impedindo assim o desprendimento das mesmas (RIBEIRO, 2010).

- camada lúcida: presente na palma das mãos e planta dos pés conferindo maior espessamento da pele nessas regiões (RIBEIRO, 2010)

- camada córnea: é a camada mais externa da epiderme, sendo resultado final do processo de diferenciação celular. Os corneócitos, células que formam esta camada, são células anucleadas, poligonais e planas com cerca de 1µm de espessura e 40µm de largura, variando o diâmetro e área superficial do corpo, sexo e idade. Embora uma camada muito fina, o estrato córneo é uma eficiente barreira, protegendo o corpo da desidratação. Os lipídeos disponíveis no estrato córneo formam membranas lamelares intercelulares que retêm água, conservando a superfície da pele saudável e macia (LEONARDI, 2004; RIBEIRO, 2006).

2.1.2 Derme

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

As terminações nervosas localizadas na derme recebem os estímulos do meio ambiente, e os transmitem ao cérebro, através dos nervos. Estes estímulos são traduzidos em sensações, como dor, frio, calor, pressão, vibração, cócegas e prazer (OLIVEIRA, 2010).

Vasos sanguíneos nutrem e regulam a temperatura da pele, e a termoregulação é considerada como o resultado de contínua alternância entre vasoconstrição e vasodilatação dos capilares em função da situação ambiental, contribuindo para o controle da temperatura corporal (OLIVEIRA, 2010).

As glândulas sudoríparas liberam o suor que é incolor, inodoro, composto de 99% de água e solutos encontrados no plasma. O forte odor do suor é causado por bactérias presentes nas regiões sudoríparas. Também devido ao suor da pele é mantida a temperatura corporal (LEONARDI, 2010). As glândulas sudoríparas se dividem em apócrinas e écrinas. As apócrinas que são tubulares e conectadas ao folículo piloso, encontrando-se presentes principalmente nas axilas, região anogenital, canal auditivo externo e pálpebras secretando, sob estímulo hormonal, material viscoso, leitoso e inodoro. As écrinas estão distribuídas praticamente em todo o corpo, mas principalmente na palma das mãos, sola dos pés, fronte e axilas, sendo controladas pelo sistema nervoso colinérgico, e secretam o suor, inodoro, rico em água, sais minerais e pobre em material orgânico (RIBEIRO, 2010).

Glândulas sebáceas: estão associadas ao folículo piloso exceto nas regiões dos lábios, mamilos e auréolas. Estão distribuídas em grande proporção no couro cabeludo, face, tórax e ombros, estando ausentes na palma das mãos e planta dos pés. A secreção sebácea é composta por triglicerídeos, ceras, esqualeno, ácidos graxos e ésteres de colesterol, com a função de barreira hidrorrepelente (RIBEIRO, 2010).

2.1.3 Hipoderme

A hipoderme, camada subepidérmica é formada por células preenchidas por material graxo, tendo espessura bastante variável. Esta camada apóia e une a epiderme e a derme ao restante do corpo e permite que as duas primeiras camadas deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo. Além disso, a hipoderme mantém a temperatura corporal, acumula energia para o desempenho das funções biológicas, protege o organismo contra agressões mecânicas e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (OLIVEIRA, 2010)

2.1.4 Funções da Pele

A espessura da pele varia de acordo com a área do corpo, idade e hidratação. A epiderme apresenta-se entre 40- 80 μm , enquanto a derme apresenta cerca de 800 - 1500 μm de espessura e a hipoderme depende da zona do corpo e dieta alimentar. Em geral, a pele mais espessa encontra-se em regiões sujeitas a pressões e atritos constantes. A pele pode ainda ser classificada como pilosa, revestindo a maior parte do corpo ou glabra (figura 3), que reveste a palma das mãos e a planta dos pés (RIBEIRO, 2006; PAILLER-MATTEI *et al.*, 2007).

Figura 3: Representação histológica da pele, ilustrando os tipos de pele (pilosa e glabra) e os receptores encontrados na pele.
(Fonte: BEAR, 2002)

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

O estrato córneo (espessura média de 10-20 μm) é a camada mais externa da epiderme e consequentemente da pele, atuando como barreira para proteger o corpo de fatores nocivos, limita a perda de água para o ambiente externo e previne a entrada de microrganismos ou substâncias químicas (PAILLER-MATTEI, 2007).

As funções vitais do estrato córneo são fortemente dependentes do seu conteúdo aquoso e desta forma, a integridade do mesmo é fundamental para a hidratação da pele e para a manutenção de uma pele saudável, sendo este objetivo das formulações cosméticas (VERDIER-SÉRVRAAIN, BONTÉ; 2007; JOHNSEN, MARTINSEN, GRIMNES; 2009).

A habilidade do estrato córneo em reter água está relacionada à presença de compostos higroscópicos conhecidos como *Natural Moisturizing Factor*- NMF e a presença de lipídios extracelulares ordenadamente arranjados para formar a barreira contra a perda transepidérmica de água (*TransEpidermal Water Loss* TEWL). O NMF é composto por aminoácidos livres e seus derivados (Tabela 1), estando presente em altas concentrações, representando cerca de 20-30% do peso do estrato córneo seco. Por absorver água da atmosfera e incorpora-la ao conteúdo aquoso natural, os componentes do NMF agem como eficientes umectantes (RAWLINGS, HARDING; 2004).

Tabela 1: Composição química do *Natural Moisturizing Factor* (NMF).

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

Fonte: Rawlings, Rarding; 2004.

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

Para manutenção das funções da pele, a hidratação torna-se indispensável, e quando adequadamente umectada melhora o aspecto geral e retarda o envelhecimento. Neste contexto, os hidratantes são produtos utilizados com a finalidade de manter o estrato córneo hidratado (JOHSEN, MARTINSEN, GRIMNES; 2009).

2.1.5 A pele e produtos cosméticos

Produtos cosméticos especialmente os hidratantes, são recomendados para melhorar a aparência da superfície aumentando a hidratação do estrato córneo e melhorar as propriedades da pele, tornando-a úmida, lisa e macia. Esse aspecto de superfície lisa pode ser observado imediatamente após aplicação de um produto hidratante ou emoliente, como resultado do preenchimento dos espaços entre as células e a pele parcialmente descamada (KIN *et. al.*; 2007).

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

Produtos cosméticos com ação hidratante podem ser constituídos de umectantes, óleos, lipídeos, material aquoso, tensoativos e outros. Os constituintes dos óleos têm ação emoliente e promovem a oclusão da superfície da pele hidratando-a, pois, ocorre retenção de material hídrico, o fator fisiológico é normalmente regulado prevenindo o ressecamento da mesma. Os óleos, umectantes e emolientes contribuem para a hidratação e suavidade da pele (KIN *et. al.*; 2007).

A hidratação da superfície da pele pode ser mensurada pela medida da capacitância elétrica envolvendo a aplicação ao estrato córneo de uma corrente elétrica à baixa frequência e intensidade. São realizadas várias medidas comparativas em regiões com e sem o produto cosmético a fim de avaliar o efeito hidratante do produto sobre a pele (HARRIS, 2003). Em se tratando de produtos cosméticos, a medida da hidratação da pele é a mais empregada uma vez que o apelo mais desejado para os produtos hidratantes é evitar a desidratação e prevenção do envelhecimento cutâneo (BAREL, CLARYS, GABARD; 1999).

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

2.2 Emulsões

Diferentes produtos cosméticos estão baseados na tecnologia das emulsões, sendo estes sistemas de acordo com a visão crítica do consumidor, a melhor forma farmacêutica e mais atrativa para a cosmetologia. As emulsões são utilizadas em produtos cosméticos, pois possuem bom aspecto visual, sendo agradáveis ao toque e ao olho humano (DIAVÃO, 2009). A sensação agradável promovida pelo uso de um produto cosmético é fundamental para a aceitação do consumidor (MASSON, 2005).

Uma emulsão é definida com um sistema heterogêneo, constituído pela dispersão de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de gotículas ou glóbulos que se tornam homogêneas pela adição de substâncias tensoativas que emulsificam o sistema (FRIBERG *et al.*, 1987; WASSAN, 2007). Na terminologia das emulsões, a fase dispersa é conhecida como interna ou descontínua e a fase dispersante como externa ou contínua (LEONARDI, 2004; WASAN, 2007).

Tipicamente, emulsões contêm fase aquosa e oleosa, onde o líquido menos polar representa a fase oleosa e o mais polar representa a fase aquosa. Dependendo de como as fases oleosa e aquosa se dispõem em um sistema disperso, podem existir diferentes tipos de emulsões (SALANGER, 2000). De acordo com a hidrofília e lipofília da fase dispersante, estes sistemas classificam-se em óleo em água (O/A) no qual, a fase interna é oleosa e a fase externa aquosa, ou água em óleo (A/O) sendo a fase interna aquosa e a externa oleosa (MORRISON, 2002; MARTI-MESTRES, 2002; LEONARDI, 2004).

As bases auto-emulsionantes são muito empregadas no preparo de emulsões estáveis (LEONARDI, 2004), sendo as aniônicas mais utilizadas no preparo das emulsões (DIAVÃO, 2009). Os benefícios do uso dessas bases são: curto tempo de pré-formulação para definir as porcentagens relativas dos componentes; simplificar a formulação; proporcionar estabilidade por longo período. Além disso, algumas bases auto-emulsionantes possuem propriedades hidratantes que são observadas mesmo na ausência de ativos hidratantes específicos (GONÇALVES, 2000; MASSON, 2006).

As emulsões não devem ser irritantes, não devem degradar e ser compatível com o ativo e aditivos (DIAVÃO, 2009). As mais adequadas para o uso tópico são semi sólidas e fluídas do tipo O/A devido ao toque menos oleoso durante e após a aplicação (MORRISON, 2002; MARTI-MESTRES, 2002; LEONARDI, 2004). Segundo Eccleston (1997) as propriedades coloidais das emulsões podem influenciar a biodisponibilidade do ativo.

2.2.1 Processos de instabilidade física e química de emulsões

As propriedades físico-químicas dos componentes da formulação podem influenciar no processo de obtenção, tipo e estabilidade do sistema, assim como no comportamento de fases da dispersão (SAJJADI *et al.* 2003). A instabilidade física do sistema manifesta principalmente através dos seguintes fenômenos (figura 4) (SILVA; SOARES, 1996, SCHUELLER; ROMANOSWKI, 1998; TADROS, 2004; FREDERICK; WALSTRA; DEWETTINCK, 2010):

- ✓ **cremeação ou sedimentação** (causada pela gravidade): processo em que os glóbulos tendem a se separar da fase externa da emulsão, emergindo (cremeação) (figura 4a) ou sedimentando (sedimentação) (figura 4b), dependendo da diferença de densidade entre as duas fases. A emulsão resultante terá duas porções uma contendo maior volume de fase externa e outra maior volume de fase interna;
- ✓ **floculação** (causada pelas forças de atração de Van der Waals): processo onde ocorre a agregação reversível das gotículas, com manutenção do filme interfacial, formando uma rede bidimensional, sem coalescência (figura 4c);
- ✓ **coalescência** (induzida pelo afinamento e ruptura do filme entre as gotículas): processo onde duas ou mais gotículas da fase dispersa aproximam-se uma da outra com energia suficiente para fundirem-se e formarem uma gotícula maior. Este processo é irreversível e resultará na separação de fases da emulsão (figura 4d).

Figura 4: Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões, sendo: (a) cremeação; (b) sedimentação; (c) flocculação e (d) coalescência (separação de fases). Adaptado de Tadros (2004)

2.2.2 Cristais líquidos e estruturas lamelares em fase gel

Os cristais líquidos são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu a existência de um estado intermediário da matéria entre o sólido e o líquido. Em 1922, Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (mesos = intermediário, morphé = forma) (ANDRADE, 2008). Os cristais líquidos são substâncias encontradas num estado intermediário da matéria, entre o sólido cristalino e o líquido isotrópico, sendo também denominado de mesofase ou estado mesomórfico. Exibem propriedades ópticas típicas do estado cristalino (anisotropia e birrefringência) e propriedades mecânicas típicas do estado líquido (CIOCA & CALVO, 1990, SANTOS, 2006).

As fases líquido-cristalinas são fluídos complexos anisotrópicos que existem como resultado da ordenação das moléculas de tensoativo, armazenando água entre suas lamelas. Essas estruturas promovem maior estabilização de emulsões, promove um aumento na viscosidade do sistema e forma uma interface ao redor do glóbulo impedindo a coalescência (SANTOS, 2006).

As técnicas mais utilizadas para identificação de cristais líquidos é a microscopia sob luz polarizada, porém, existem outras técnicas físico-químicas como difração de raios-X, ressonância magnética nuclear, calorimetria e a reologia (TYLE, 1989; PARK *et al.*, 2001, OLIVEIRA, 2010).

São classificados em duas grandes categorias:

- ✓ **Termotrópicos:** são constituídos por substâncias orgânicas, dependem do aumento da temperatura do sistema. (TYLE, 1989). Têm aplicação na fabricação de dispositivos eletro-ópticos e sensores de temperatura e pressão (BECHTOLD, 2005).
- ✓ **Liotrópicos:** dependem da interação entre moléculas anfifílicas dos tensoativos e água. Quando o tensoativo e a água são submetidos a um aumento na temperatura, as cadeias lipofílicas rearranjam-se em um estado líquidos desordenado e a água penetra entre as cadeias hidrofílicas. Após o resfriamento as cadeias hidrofílicas se reorganizam e mantêm a água entre as lamelas. Essa conformação é a estrutura líquido-cristalina liotrópica. Têm capacidade de refletir a luz polarizada apresentando birrefringência que pode ser observada por meio de microscopia de luz polarizada (SANTOS, 2006).

Podem estar presente em emulsões contendo um único tensoativo, ou misturas de tensoativos de cadeias curtas (com menos de 12 átomos de carbono) e em formulações

contendo lecitinas. Nestes casos as cadeias carbônicas das bicamadas lipídicas estão desordenadas, semelhantes a líquidos (ECCLESTON, 1990; OLIVEIRA 2010).

Em estudos recentes realizados por Oliveira (2010) com difração de raios -X, pode-se observar que as cadeias carbônicas do tensoativo organizada em bicamadas lamelares nas emulsões, podem estar no estado ordenado (fase gel) ou desordenado (cristal líquido). Diversos artigos na literatura discutem a presença de bicamadas lamelares em emulsões chamando-as de fase líquido-cristalina, porém, as características físico-químicas e composição das formulações sugerem que se trata de estruturas lamelares cujas cadeias se encontram na fase gel, o que não invalida as propriedades atribuídas tais como (i) proteção dos ativos incorporados frente à foto e termodegradação, (ii) aumento da retenção de água e consequente hidratação do estrato córneo e, (iii) aumento da estabilidade físico-química (CIOCA & CALVO, 1990; AUVRAY *et al.*, 1997. FORSTER *et al.*, 1997; FRIBERG, 1997; BRIONON *et al.*, 1998; ENGLES & RYBUNKY, 1998; NESSEEM, 2001; KUNIEDA, 1999, 2001; AL-BAWAB, FRIBERG, 2004; SAULNIER *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011).

A transição de fase cristalina para a fase gel ocorre numa determinada temperatura e depende das características do tensoativo. Quanto maior a cadeia carbônica e/ou quanto menor o grau de insaturação maior será a temperatura de transição (ECCLESTON, 1990).

As estruturas lamelares em fase gel consistem em bicamadas de moléculas do tensoativo separadas por água livre (BARRY, 1989). Podem ser formadas em meio aquoso por uma gama de agentes de superfície submetidos a condições específicas. As cadeias carbônicas na bicamada estão agrupadas em uma sub-célula hexagonal onde as cadeias estão ordenadas (OLIVEIRA, 2010).

A fase gel lamelar e cristal líquido são formadas em emulsões compostas por tensoativos e água. Durante o processo de produção, os componentes são fundidos e em seguida adicionados à água sob agitação controlada. Quando a temperatura do sistema atinge de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$ ocorre formação de uma monocamada de tensoativo ao redor dos glóbulos da fase interna da emulsão. Durante o processo de arrefecimento as substâncias anfifílicas tornam-se mais hidrossolúveis e facilitam a formação da interfaces óleo/água e posteriormente originam vesículas multilamelares denominadas cristal líquido. Quando o sistema atinge temperatura entre 40°C e 50°C ocorre a transição dos cristais líquidos para fase gel lamelar. Nesse momento as cadeias carbônicas do tensoativo ao redor do glóbulo apresentam-se em estado organizado (Figura 5). Esta mudança depende da natureza do

tensoativo e da concentração utilizada na formulação (ECCLESTON, 1990, 1997, 2000; OLIVEIRA, 2010).

Figura 5: Esquema representando a transição de cristal líquido para fase gel lamelar de acordo com a temperatura de transição (T_t). Adaptado de Eccleston (1990). (Fonte: OLIVEIRA, 2010).

Misturas de tensoativos iônicos ou não iônicos derivados de alcoóis ou ácido graxos de cadeia longa tendem a formar estruturas lamelares na fase gel quando empregados em emulsões. Estas apresentam boa estabilidade e consistência que podem ser explicados pela presença de tais estruturas (ECCLESTON, 1990; KÓNYA, 2003, 2007).

2.3 Comportamento reológico

A designação Reologia deriva da palavra grega *rheo* (que significa escoamento) e representa o estudo das propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças. O objetivo da reologia é a descrição das relações entre as tensões e deformações, através do comportamento de fluxo (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

O comportamento reológico é um importante parâmetro para o desenvolvimento de produtos, assim como em qualquer processo de investigação de estabilidade física dos mesmos. É aplicado na área cosmética, farmacêutica, alimentícia, agroquímica, colas, polímeros entre outros (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

Através da análise do comportamento reológico identifica-se dois tipos de comportamentos de acordo com as características de fluxo: o Newtoniano e o não-

Newtoniano. O fluxo Newtoniano apresenta valores constantes de viscosidade, independentemente da força externa aplicada, ou seja, a relação entre o gradiente e a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional. São exemplos de fluidos Newtoniano: água, glicerina, óleos vegetais. No fluxo não-Newtoniano, esta relação não é proporcional, ou seja, com o aumento da força aplicada há alteração da viscosidade inicial, podendo diminuir na maioria das vezes (fluxo pseudo-plástico) ou raramente aumenta (fluxo dilatante). São exemplos de fluidos não-Newtoniano: Cremes, loções, xampus (GASPAR, 2003; GUARATINI, 2004).

O fluxo pseudo-plástico é o mais comum e mais interessante para produtos cosméticos e caracteriza-se pela diminuição da resistência do material ao escoamento, como o aumento da taxa de cisalhamento ou deformação, o que permite espalhamento adequado e boa cobertura sobre a pele (BOODTS, 2003). Este tipo de fluxo pode apresentar uma característica particular, a tixotropia, que pode ser representada quantitativamente pela área de histerese formada entre as curvas ascendentes e descendentes de um gráfico (reograma) que representa a relação entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento (ALMEIDA; BAHIA, 2003). A tixotropia fornece informação da capacidade que uma formulação tem em reconstituir sua estrutura após a aplicação de uma força, sendo que valores elevados, por exemplo, indicam que o sistema requer longo tempo para reconstituição da estrutura (MASSON *et al.*, 2005).

As propriedades reológicas de produtos semi-sólidos são parâmetros físicos importantes, tanto em termos estéticos quanto técnicos (preparo, envase e armazenamento). A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações testes e produtos finais. A relação entre reologia e estabilidade, especialmente no caso de emulsões, tem sido reconhecida como parâmetro importante no desenvolvimento das mesmas (MORAIS *et al.*, 2005).

Características sensoriais e performance do produto são frequentemente relacionados às suas propriedades reológicas, principalmente às propriedades de fluxo, que determinam a consistência e espalhabilidade fácil e sem escoamento excessivo do produto. É necessário que haja espalhamento com conseqüente cobertura total da região de aplicação (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

2.4 Óleo de Girassol

No presente estudo, utilizamos óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) como fase oleosa. O óleo de girassol (figura 6) contém vários tipos de ácidos graxos: saturados (ácidos laurílico $C_{12:0}$, mirístico $C_{14:0}$, palmítico $C_{16:0}$, e esteárico $C_{18:0}$), monoinsaturado (ácido oléico $C_{18:1, n-9}$), e poliinsaturados (ácidos linoléico $C_{18:2, n-6}$, e α -linolênico $C_{18:3, n-3}$) (PEDERSEN, 2000). Já é sabido da literatura o poder de reversão e cura de feridas na pele e dermatoses cutâneas após aplicação tópica de óleo de semente de girassol, que contém alta concentração de ácido linoléico (WENDT, 2005). Na cosmetologia, o óleo de girassol está sendo utilizado em sabonetes, cremes, hidratantes e produtos de limpeza. Além disso, o óleo de girassol é muito utilizado na preparação de emulsões cosméticas também por conterem vitamina E (RAHETE *et al.*, 2007). A vitamina E está recebendo crescente atenção da indústria de cosméticos por causa das suas propriedades antioxidantes (THIELE, 2007). Existem evidências de que a vitamina E diminui o crescimento de melanoma promovendo apoptose da célula tumoral e inibindo angiogênese (MALAFA *et al.* 2002; GUEVARA, 2003).

Figura 6: Óleo de Girassol

(Fonte: http://www.aboissa.com.br/produtos/view/407/oleo_de_girassol)

Os polifenóis constituem uma classe de produtos fenólicos presentes na natureza e encontram-se disponíveis nos frutos, sementes, flores e cascas (WOLLGAST; ANKLAN, 2000). O nome polifenóis vem da nomenclatura *poli* que quer dizer muitos e de *fenol* que é um composto químico. O fenol é constituído por um anel aromático ligado a um grupo

hidroxila (OH). Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Atualmente existe mais de 4000 estruturas fenólicas conhecidas (FILHO; SILVA; BOVERIS, 1999).

Os polifenois de girassol são potentes antioxidantes devido aos sequestros de radicais livres (VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998). Nos últimos anos tem sido motivos de muitos estudos, pois, apresentam agentes preventivos contras inúmeras doenças degenerativas, além de proteger o tecido contra o estresse oxidativo. Vários estudos *in vitro* têm mostrado que os polifenois de girassol apresentam ações protetoras contra vários tipos de câncer, como pele, próstata e mama. Além de diminuir a incidência de varias doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; TAPIERO *et al.*, 2002; CHIOU *et al.*, 2007). Apresentam também características como anticarcinogênicas, antiaterogênicas, antitrombóticas, antimicrobianas, vasodilatadoras e analgésicas. Exercem esses benefícios pelo seu poder antioxidantes (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

Em um estudo realizado por Weisz, Kammerer e Carle (2009), compostos fenólicos foram extraídos das sementes e cascas das sementes de girassol demonstrou que pode ser utilizada como antioxidante natural. Além disso, os resíduos da extração do óleo demonstraram-se ainda ricas em fenólicos antioxidantes. A oxidação no organismo ocorre devido à ação de radicais livres que são formados nos processos biológicos. As reações de oxidação estão associadas a doenças degenerativas, devido aos danos oxidativos provocados no DNA, proteínas e outras macromoléculas. O organismo controla estas reações por meio de mecanismos antioxidantes que diminuem a atividade dos radicais livres. Os antioxidantes presentes nas plantas e alimentos são capazes de regular a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (MERCALI, 2011).

2.5 Radicais Livres e Antioxidantes

O envelhecimento caracteriza-se pelo desgaste dos vários setores do organismo humano, gerando funcionamentos inadequados, que culminam em alterações incompatíveis com a vida. Os radicais livres está relacionado com o processo de envelhecimento cutâneo e de vários outros órgãos do corpo humano. Os Radicais Livres ou Espécies Reativas e Oxigênio (EROs) são formados naturalmente pelo metabolismo humano, mas fatores como poluição do ar, tabagismo, exposição a radiação, falta de exercícios físicos, ingestão de álcool e processos inflamatórios também são fontes de espécies reativas de oxigênio (STEINER, 2011).

Os radicais livres são moléculas, que em sua orbita externa, apresentam elétrons desemparelhados, sendo, portanto, instáveis ou reativos. Para atingir estabilidade, essas moléculas captam elétrons de outras moléculas químicas e de componentes vitais do organismo, como DNA, elementos citoesqueléticos, membranas e proteínas celulares (STEINER, 2011)

Quando nosso organismo produz mais radicais livres do que antioxidantes, acontece um desequilíbrio no organismos, denominado como estresse oxidativo, que causa maior dano ao organismo (HALLIWEL, 2009). A melhor maneira de combater os radicais livres é a utilização antioxidantes e enzimas, como as vitaminas A, C e E e as enzimas catalase, Co-Q10, peroxidase (PIERCE, 2005) A figura 7 ilustra a ação do radical livre na célula.

Figura 7: Ação do radical livre na célula (Fonte: MARUNO, 2009).

Recentemente, compostos químicos com atividade antioxidante presentes em vegetais tem atraído grande atenção devido ao papel na prevenção de doenças causadas pelo estresse oxidativo, devido à baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Acredita-se que a ingestão de substâncias antioxidantes através do consumo de plantas possa prevenir doenças degenerativas, devido a atividade anti radicais livres, pois hoje é bem estabelecido que os radicais livres contribuem para a origem de várias doenças como a arteriosclerose , inflamação crônica, neurodegeneração e câncer. A mesma atenção tem sido dada ao desenvolvimento de antioxidantes naturais obtidos através de fontes

botânicas, para o uso em formulações cosmética anti-idade, sabe-se que os radicais livres estão relacionados ao processo de envelhecimento cutâneo (PEREIRA, 2011).

2.6 Ésteres Graxos

Para melhorar as propriedades sensoriais de formulações cosméticas para o cuidado da pele são utilizados além de umectantes e óleos vegetais os ésteres graxos (emolientes), modificadores de reologia, emulsificantes e umectantes. Ésteres são Ingredientes cosméticos que ajudam a manter a suavidade da pele e a plasticidade, pois formam um filme semi-oclusivo na pele melhorando a hidratação, reduzir a sensação de irritação muitas vezes presente na pele seca e melhorar a aparência do estrato córneo. Como componentes de formulações cosméticas, ésteres atuam principalmente como hidratantes, plastificantes e modificadores tátil quando aplicado à pele (GORCEA, LAURA, 2010)

Os ésteres utilizados geralmente em emulsões para o cuidado da pele, geralmente são usados em uma concentração 1 a 20% na formulação, dependendo da finalidade do uso, também são utilizados como solubilizantes de filtro UV, geralmente são compatíveis com todos os componentes das formulações. Portanto, ésteres graxos desempenham um importante papel em formulações cosméticas, influencia no aspecto visual das formulações (aspecto brilhoso) e sensorial, além de manter a pele hidratada (GORCEA, LAURA, 2010)

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

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Desenvolver emulsões contendo cristais líquidos utilizando a associação de óleo de girassol e vaselina, e bases auto-emulsionantes de caráter iônico (à base de éster fosfórico) e não iônico, a partir do diagrama ternário de fases.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver emulsões pelo método do diagrama ternário de fases;
- ✓ Identificar e analisar os tipos de estruturas cristalinas;
- ✓ Avaliar a estabilidade e características físico-químicas das emulsões;
- ✓ Avaliar o comportamento reológico das formulações;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do óleo de girassol;
- ✓ Estudo da influência de ésteres na formação e manutenção do cristal líquido da formulação;
- ✓ Análise da performance do produto *in vivo* frente à avaliação da hidratação, oleosidade, valor de pH cutâneos e irritação cutânea (CEP/FCFRP n° 031/2009).

MATERIAL

E

MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Óleos:

- ✓ **Óleo de girassol** (INCI: *Helianthus annus* L.) (fornecido pela Lipo do Brasil).
- ✓ **Vaselina líquida** (INCI: *Mineral oil*) (fornecido pela labsynth)

Justificativa ao uso do óleo mineral

Uma tendência da indústria cosmética mundial é a utilização de materiais primas renováveis de origem vegetal, no início de nossos estudos formulamos a princípio com óleo mineral e observamos a formação das estruturas líquido cristalinas, posteriormente manipulamos a mesma formulação substituindo o óleo mineral pelo óleo girassol e observamos a formação dos cristais líquidos porém, em menor quantidade comparada as formulações manipuladas anteriormente com óleo mineral.

4.1.2 Bases auto-emulsionante

- ✓ **Aniônico:** Crodafos[®] CES (INCI: *Cetearyl Alcohol and Dicetyl Phosphate and ceteth-10 Phosphate*).

É uma cera auto-emulsionante a base de fosfato otimizada, constituída de ésteres complexos de ácido fosfórico e álcool cetosteárilico, que em sistemas óleo/água (O/A), formam emulsões extremamente estáveis. É considerado “cripto-aniônico”, devido aos grupos de fosfatos serem protegidos por cadeias alquílicas (informe técnico – CRODA 2011).

- ✓ **Não iônico:** Dermabase[®] Vegetal (INCI: *Cetearyl Alcohol and Glyceryl Stearate and PEG-2 Stearate and Stearic Acid and Ceteth-10 and Polysorbate 60 and Theobroma grandiflorum seed butter and Helianthus annuus seed oil and Cetyl Palmitate*) (fornecido pela Croda Brasil).

A Dermabase Vegetal possui a capacidade de formar emulsões altamente estáveis do tipo O/A, para o preparo de cremes e loções. A característica e a natureza diversificada de seus componentes resultam em produtos com propriedades umectantes, emolientes e hidratantes conferindo o espalhamento rápido sobre a pele e áreas relativamente extensas, formando uma película fina e protetora. É compatível com a maioria dos compostos utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos (informe técnico – CRODA 2011).

4.1.3 Aditivos

4.1.3.1 Ésteres:

A maioria dos ésteres auxiliam na formação do filme semi-oclusivo na pele. São conhecidos como emolientes e suas propriedades auxiliam na hidratação e suavidade da pele, proporcionam um sensorial suave a macio e alguns com propriedades de toque seco. Pode ser utilizado também como solvente e ajuda a melhorar a textura e espalhabilidade de emulsões. Apresenta boa solubilidade em produtos com alta polaridade (informe técnico – CRODA 2011).

Benefícios:

- ✓ Emoliente com toque seco;
- ✓ Espalha facilmente sobre a pele;
- ✓ Proporciona sensorial suave e macio;
- ✓ Agente oclusivo;
- ✓ Agente doador de brilho para formulações cosméticas;
- ✓ Modificadores de viscosidade;

Utilizados em cremes, loções, condicionadores, pomadas, batons, maquiagens (informe técnico – CRODA 2011).

- ✓ **Alquil Benzoato** – Crodamol® AB (INCI: *C12-15 Alkyl Benzoate*)

Figura 8: Estrutura química do Aquil Benzoato

(Fonte: <http://www.balticnordic.com/c12-15-alkyl-benzoate/supplier.html>)

- ✓ **Lactato de Cetila** - Crodamol® CL (INCI: *Cetyl lactate*)

Figura 9: Estrutura química do Lactato de Cetila

(Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9212260_EN.html)

- ✓ **Palmitato de Cetila** - Crodamol[®] CP (INCI: *Cetyl Palmitate*),

Figura 10: Estrutura química do Palmitato de Cetila

(Fonte: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8749079.html)

- ✓ **Caprílico Triglicerídeos** - Crodamol[®] GTCC (INCI: *Caprylic/Capric Triglyceride*)

Figura 11: Estrutura química do Caprílico Triglicerídeos

(Fonte: <http://guide8473.guidechem.com/pro-show774322.html>)

- ✓ **Lactato Laurico** - Crodamol[®] LL (INCI: *Lauryl lactate*)

Figura 12: Estrutura química do Lactato Laurico

(Fonte: http://www.chemicalbook.cn/ChemicalProductProperty_EN_CB6506317.htm)

- ✓ **Ester Cetílico** – Crodamol SS-PA (INCI: *Cetyl Esters*)

Figura 13: Estrutura química do Ester Cetílico

(Fonte: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7256716.htm)

- ✓ **Estearato de Octila** – Crodamol[®] OS (INCI: *Octyl Stearate*)

Figura 14: Estrutura química do Estearato de Octila

(Fonte: <http://www.lookchem.com/OCTYL-STEARATE>)

- ✓ **Miristato de Isopropila** - Crodamol[®] IPM (INCI: *Isopropyl Myristate*)

Figura 15: Estrutura química do Miritato de Isopropila

(Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Isopropyl_myristate.png)

- ✓ **Palmitato Etoxílico** - Crodamol[®] OP (INCI: *Ethylhexyl Palmitate*)

Figura 16: Estrutura química do Palmitato Etoxílico

(Fonte: http://www.chemicalregister.com/Octyl_2Ethyl_Hexyl_Palmitate/Suppliers/pid9883.htm)

- ✓ **PPG-3 Miristato Eter Benzílico** - Crodamol[®] STS (INCI: *PPG-3 Benzyl Ether Myristate*)

Figura 17: Estrutura química do PPG-3 Miristato Eter Benzílico

(Fonte: <http://www.coleparmer.com/buy/product/38889-benzyl-methyl-ether-99-100g-yo-88339-79.html>)

4.1.3.2 Ativo

- ✓ **Polifenois de Girassol** – Heliogenol® (INCI: *Butylene Glycol and Helianthus Annus (Sunflower) seed Extract*) (fornecido pela Croda Brasil).

Os polifenois de girassol em estudos in vitro e ex vivo apresenta ótima atividade antioxidante, contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio causadas principalmente por radiação ultravioleta, pode ser utilizado em cremes, loções e xampus (informe técnico – CRODA 2011).

4.1.4 Conservante

- ✓ **Antimicrobiano.** INCI: *DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate*. Descrição: alta atividade antimicrobiana para uma ampla variedade de formulações cosméticas. Estável por longos períodos de tempo, em ampla faixa de valores de pH e temperatura. Concentração de uso: 0,03 a 0,3%. Deve ser adicionado na fase de arrefecimento do produto final a 45°C. Nome comercial: Glydant® plus (informe técnico - LONZA).

4.1.5 Equipamentos

Balança analítica Denver Instruments Company, modelo A-250 com precisão de 4 casas; balança eletrônica Marte, modelo A-2000, com precisão de 2 casas; agitador Fisatom, modelo 713-D; chapa de aquecimento Fisaton, modelo 153-B; banho termostatzado da Nova Técnica Ltda, modelo 281-NT; centrífuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R; sistema purificador de água, osmose reversa OS 10LX, GEHAKA; microscópio Olympus, modelo BX 50; peagômetro Analion, modelo PM-608; condutivímetro Digimed, modelo CD-20; potes plásticos com capacidade de 50 e 100g; refrigerador Eletrolux, modelo RDE-37; estufa Fanem Ltda, modelo 002-CB; espectrofotômetro Hitashi U2001; Corneometer CM 820 (Courage + Khazaka); balança Analítica, Mettler Toledo, modelo AG204;

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Desenvolvimento da emulsão

4.2.1.1 - Obtenção da emulsão

As emulsões foram preparadas pelo método de EPI (*Emulsion Phase Inversion*). As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à temperatura de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa mantendo-a sob agitação (600 rpm) (agitador mecânico Fisaton-Mod. 713) até que a emulsão atingisse a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2.1.2 - Determinação das concentrações de óleo-água-tensoativos através do diagrama ternário de fases.

As formulações foram desenvolvidas seguindo o método do diagrama ternário. Este é representado no plano como triângulo equilátero onde os três constituintes são simétricos. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: óleo/ água/ tensoativo. O diagrama foi obtido inicialmente variando as concentrações de 10 em 10%, com o objetivo de obtenção de emulsões O/A apenas a região do diagrama com maior concentração de água foi utilizada, obtendo-se assim 6 formulações para cada sistema proposto. Após determinação da região onde foi possível obter emulsões com as características desejadas, o diagrama foi repetido nesta região variando de 5 em 5% as concentrações dos componentes da formulação (MORAIS *et al.*, 2009)

4.2.2 - Análise macroscópica das formulações:

As análises das amostras foram realizadas vinte e quatro horas após o preparo (estabilidade intrínseca) (ROLAND *et al.*, 2003), e foram observadas características organolépticas e homogeneidade das formulações, identificando possíveis processos de instabilidade, tais como cremeação e coalescência (FERRARI *et al.*, 2003).

4.2.3 - Análise microscópica das formulações:

Uma fina camada de cada amostra foi depositada em lâmina e coberta com lamínula para ser diretamente observada no microscópio sob luz normal e polarizada (Microscópio Olympus BX 50). Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e com auxílio de polarização, observou-se a presença de anisotropia. Somente as emulsões com anisotropia foram selecionadas para continuação dos estudos. O aspecto microscópico das

estruturas anisotrópicas foi utilizado para a caracterização do tipo de fase líquido-cristalina (TYLE, 1989).

4.2.4 - Testes preliminares de estabilidade da emulsão

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis após vinte e quatro horas de preparo foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade: centrifugação, estresse térmico, pH e condutividade (ANDRADE, 2008).

4.2.4.1 - Teste de centrifugação

Foram pesados cerca de 5 g das formulações teste em tubos cônico graduados para centrífuga. Procedeu-se ao ensaio da centrifugação (Excelsa Baby II centrífuga - Fanem Ltd., São Paulo, Brasil), o ensaio foi realizado em triplicata, nas seguintes condições: temperatura ambiente (24 ± 2 °C); velocidades de rotação de 1.000, 2.500 e 3.500 rpm; mantendo-se por 15 minutos em cada valor de velocidade (RIBEIRO *et al.*, 1996). Após o ensaio as formulações foram analisadas:

N: Normal, sem alteração quanto ao aspecto (ausência de separação de fases)

M: Modificada (presença de cremeação ou coalescência)

4.2.4.2 - Estresse térmico

As emulsões foram submetidas ao estresse térmico, promovendo aquecimento em banho termostatzado na faixa de temperatura de 40 ± 2 a 80 ± 2 °C, aumentando a temperatura em 5 em 5 °C. As amostras foram mantidas em cada temperatura durante 30 minutos e então avaliadas macroscopicamente. (BRACONI *et al.*, 1995).

Para este teste, a seguinte nomenclatura foi empregada para classificá-las (RIBEIRO *et al.*, 1996) :

N= Normal; sem alteração; **LM**= Levemente Modificado; **M**= Modificado

IM= Intensamente Modificado.

4.2.5 - Determinação do valor de pH

Foram adicionados em um tubo de ensaio 1,0 g da emulsão e 9,0 g de água recém purificada sendo homogeneizada com auxílio de “mixer”. O valor do pH foi determinado inserindo o eletrodo (analion peagômetro-Mod. PM608) na solução da amostra (DAVIS, 1997). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.6 - Determinação da condutividade elétrica

Foi utilizado o condutivímetro Tecnocon (Modelo mCA 150) aferido com solução padrão e avaliou-se a condutividade elétrica das emulsões inserindo o eletrodo diretamente na amostra (PRISTA *et al.*, 1996; DAVIS, 1997). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.7 - Teste de estabilidade acelerada

As amostras consideradas estáveis pelos testes preliminares foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada. Cinquenta gramas de cada uma foram acondicionadas em frascos de plásticos transparentes e mantidos em diferentes condições de armazenamento (RIBEIRO *et al.*, 1996; FERRARI *et al.*, 1998). Temperatura controlada: Ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), Geladeira ($4\pm 2^\circ\text{C}$) e Estufa ($40\pm 2^\circ$).

As amostras foram analisadas nos 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias de permanência em cada condição de armazenamento, sendo o 1º dia correspondente a 24 horas após o preparo das formulações. Os testes utilizados para avaliação da estabilidade foram: macroscopia, microscopia sob luz polarizada, determinação dos valores de pH e condutividade e reologia.

4.2.8 - Estudo da Viscosidade e Propriedades Reológicas da Emulsão

As determinações reológicas foram feitas em um reômetro rotacional (modelo Brookfield R/S plus Rheometer) com configuração cone-placa (*spindle* C 50-1, $d = 50\text{mm}$, $\theta = 1^\circ$), operado pelo software Rheo 2000 V2.8. Os parâmetros reológicos foram determinados a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A abertura (*gap*) entre o cone e a placa foi de 0,05mm. Os parâmetros de entrada usados para construir as curvas ascendente e descendente de Tensão de cisalhamento (Pa) e viscosidade (η) estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros usados para construir as curvas ascendente e descendente de gradiente de cisalhamento e viscosidade.

Curva	Taxa de cisalhamento		Número de etapas	Duração da etapa (s)	Tempo total (s)
	Inicial (1/s)	Final (1/s)			
Ascendente	10	100	10	6	60
Descendente	100	10	10	6	60

Os gráficos obtidos relacionam valores de tensão de cisalhamento (Pa) e viscosidade (η) com a taxa de cisalhamento (1/s). Foram obtidos valores de viscosidade diferencial (calculada na taxa de cisalhamento = 100 s^{-1}), índice de fluxo (*yield exponent*), índice de consistência (*plastic viscosity*) e tixotropia (área de histerese).

Nota: Unidade de tensão de cisalhamento $1 \text{ D/cm}^2 = 0,1 \text{ Pa}$

Unidade de viscosidade $1 \text{ cP} = 0,001 \text{ Pa.s}$

4.2.9 - Determinação *in vitro* da atividade antioxidante através da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH•

A determinação da atividade antioxidante do óleo de girassol foi realizada através da medida da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Para a solubilização do óleo de girassol utilizamos a metodologia proposta por Maruno (2009) para avaliação da atividade antioxidante de óleos vegetais. O óleo de girassol foi solubilizado em diversas concentrações de álcool isopropílico (150 $\mu\text{L}/1\text{mL}$, 125 $\mu\text{L}/1\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/1\text{mL}$, 75 $\mu\text{L}/1\text{mL}$ e 50 $\mu\text{L}/1\text{mL}$). Após a solubilização em diversas concentrações foi adicionado em um tubo de ensaio âmbar 100 μL do óleo solubilizado, 1mL da mistura de álcool isopropílico e etanol (1:1) e 250 μL da solução de DPPH• 250mM. Após 15 minutos de reação faz-se a leitura em espectrofotômetro Hitachi U2001 no comprimento de onda de 517nm. O ensaio foi realizado em triplicata. As absorbâncias das amostras foram convertidas em porcentagem de inibição pela fórmula:

$$(\%) = \frac{Abs_{amostra} * 100}{Abs_{controle}} - 100 \quad \text{Equação 1}$$

A partir das porcentagens de inibição foi calculado o IC₅₀ do radical estável DPPH• pelo GraphPad Prism software. O IC₅₀ se refere à concentração dos óleos puros que apresenta 50% de inibição do radical DPPH• (BLOIS, 1958; GEORGETTI *et al.*, 2009).

4.2.10 - Avaliação *in vivo* das emulsões na hidratação, oleosidade e valor de pH cutâneos:

A avaliação foi realizada em sala climatizada com umidade relativa e temperatura controlada (UR: $75 \pm 5\%$; T: $24 \pm 2^\circ\text{C}$). Participaram do estudo, como voluntárias, 10 mulheres de 21 a 29 anos, sem histórico de reações alérgicas a produtos cosméticos e com

a pele dos antebraços íntegra. Antes do início do teste foi feita a limpeza da região do antebraço com etanol para retirada de impurezas presente na pele. As voluntárias permaneceram na sala de testes por quinze minutos para aclimação.

Foram testadas três amostras: (I) Emulsão simples contendo óleo de girassol e cristal líquido (emulsão não aditivada), (II) Emulsão contendo óleo de girassol e cristais líquidos aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol (Polifenóis de Girassol) (III) Emulsão contendo óleo de girassol e cristais líquidos aditivadas com éster graxo miristato de isopropila (Miristato de isopropila). Como controle positivo foi utilizado duas emulsões comerciais: Comercial I, produto cosmético com custo elevado encontrada em lojas especializadas de cosméticos contendo em sua formulação óleo de girassol e ésteres graxos e Comercial II, produto menor custo e acessível encontrada em supermercados contendo óleo de girassol e ésteres graxos. As amostras foram aplicadas em regiões do antebraço previamente determinadas (Figura 18), através de movimentos circulares e suaves. As áreas de análises foram randomizadas. A avaliação de potencial hidratante, oleosidade e valor de pH cutâneos foram realizadas de acordo com protocolo proposto por Maruno (1998).

O presente teste foi realizado mediante aprovação do comitê de ética em pesquisa da FCFRP-USP (CEP/FCFRP n° 031/2009) (Segue em anexo A).

Figura 18: Regiões do antebraço demarcadas para avaliação *in vivo*.
(Fonte: OLIVEIRA, 2010).

4.2.10.1 - Avaliação da hidratação cutânea:

Foi utilizado o aparelho Corneometer[®] CM 820 (Courage + Khazaka), que avalia a capacitância da pele. O método é baseado na variação das constantes dielétricas da água e outras substâncias. Um capacitor reage a alterações de quantidade de água, expressando o resultado em unidades arbitrárias (UA) que é considerado, então, como grau de hidratação da pele (COURAGE + KHAZAKA). Foram realizadas três leituras para cada região selecionada e calculada a hidratação relativa (HR%) segundo a equação 2. Esta consiste na variação percentual entre a capacitância medida em função do tempo. As leituras foram feitas em intervalos de 30 minutos até completar o período de 150 minutos. Entre as leituras o eletrodo do equipamento foi limpo com papel até que permitisse leitura igual a zero.

Equação 2

$$HR\% = \frac{M_p \times 100}{M_c}$$

Onde:

HR% = hidratação relativa;

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

M_c = Média da capacitância das leituras das regiões controle.

4.2.10.2 - Avaliação da oleosidade cutânea

Foi empregado o equipamento Sebumeter[®] SM 810 (Courage +Khazaka) que mede a oleosidade cutânea baseado na fotometria de uma fita plástica especial de 0,1mm de espessura disposta em um carretel, avançado manualmente a cada leitura, que se torna transparente quando em contato com lipídios. Sob esta fita há uma pequena superfície espelhada que reflete a luz através da fita (Figura 19) medindo indiretamente o volume de secreção sebácea das glândulas (HARRIS, 2003). A leitura foi realizada aplicando a fita sobre a área de teste e pressionando por trinta segundos. Em seguida esta foi inserida no aparelho para a leitura fotométrica da transparência. Este dado é convertido pelo aparelho sendo o resultado expresso em µg de sebo por cm².

Figura 19: Princípio de medida do Sebumeter®. Adaptado de Harris (2003).

4.2.10.3 - Avaliação do valor de pH cutâneo:

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

4.2.10.4 - Avaliação do potencial irritante:

Para a determinação do potencial irritante das emulsões, a alteração na coloração da pele, provocada pela aplicação destes produtos foi avaliada utilizando-se o Chroma Meter CR-200, pelo sistema $L^*a^*b^*$. O modo $L^*a^*b^*$ cobre a integralidade do espectro visível pelo olho humano e representa-o de maneira uniforme. Permite, por conseguinte, descrever o conjunto das cores visíveis independentemente de qualquer tecnologia gráfica. L^* é a luminância ou luminosidade, (0 para o preto à 100 para o branco); a^* (cor) e b^* (saturação da cor) que vão respectivamente do verde ao vermelho (valores negativos para positivos) e do amarelo ao azul (valores negativos para positivos). (<http://pt.kioskea.net/contents/video/cie-lab.php3>). A Figura 20 representa esquema de cores no sistema $L^*a^*b^*$ do Chroma Meter. Para avaliar a cor superficial cutânea foi utilizado o Chroma Meter CR 200 (Minolta), o qual ilumina a pele com uma lâmpada de arco de xenônio. A luz refletida perpendicular à superfície é coletada e analisada nos comprimentos de onda de 450, 560 e 600nm utilizando o sistema $L^*a^*b^*$ (ALEWAETERS, 2000; DARLENSKI, 2008). O parâmetro utilizado para avaliação foi o a^* (parâmetro para avaliação da vermelhidão) verde para o vermelho.

Figura 20: Representação das coordenadas $L^*a^*b^*$ definida pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) (Fonte: PEREIRA, 2011).

Como o potencial irritante caracteriza-se muitas vezes pela formação de eritema, causando coloração avermelhada na pele, a avaliação do mesmo foi analisada por alterações no parâmetro a^* (PEREIRA 2011).

4.2.11 - Análise estatística:

Os resultados obtidos nos testes de estabilidade acelerada, tais como valores de pH, condutividade elétrica, comportamento reológico (índice de consistência, índice de fluxo e tixotropia) avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, valores de pH cutâneo e irritação estudados por análise estatística para detecção de diferenças significativas. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, usando one-away ANOVA análises de variância, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Determinações das concentrações de fases oleosa/aquosa/tensoativo através do diagrama ternário

Segundo Marti-Mestres (2002), a aplicação de emulsões do tipo O/A apresentam melhor espalhabilidade, fácil absorção e não deixam sensação oleosa na pele. Com objetivo de desenvolver emulsões O/A apenas a região do diagrama ternário com maior concentração de água foi utilizada (figura 21).

Figura 21: Diagrama ternário, apenas os pontos (21,27,28,34,35,36) em destaque foram utilizados para obtenção das emulsões O/A.

Como fase oleosa utilizou-se a mistura dos óleos de girassol (*Helianthus annus* L.) e mineral (vaselina) em diversas proporções (tabela 3), e na fase tensoativo utilizou a mistura das bases auto-emulsionantes Crodafos[®] CES e Dermabase[®] Vegetal (tabela 4).

Tabela 3: Concentrações da mistura dos óleos de girassol e mineral.

Óleo (O)	Girassol	Mineral
1	75	25
2	50	50
3	25	75

Tabela 4: Concentrações da mistura dos tensoativos aniônicos e não iônicos.

Tensoativo (T)	Crodafos [®] CES	Dermabase [®] Vegetal
1	75	25
2	50	50
3	25	75

A mistura dos óleos e tensoativos foram testadas em diversas concentrações para determinar a concentração ideal de cada componente da formulação, obtendo-se nove diagramas ternários: O1T1/O1T2/O1T3/O2T1/O2T2/O2T3/O3T1/O3T2/O3T3 [segue os resultados dos outros diagramas ternários desenvolvidos em apêndice A]. A mistura de óleos e tensoativos do diagrama ternário O1T1 (Óleos: 75% Girassol e 25% de Mineral e Tensoativos: 75% de Crodafos CES e 25% de Dermabase Vegetal) (tabela 5) apresentou estruturas líquido cristalinas como fase lamelar mais evidentes (tabela 6).

Tabela 5: Concentração (%) dos componentes do diagrama ternário O1T1.

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	7,5	2,5	10,0	22,5	7,5	30,0	60,0
27	15,0	5,0	20,0	15,0	5,0	20,0	60,0
28	7,5	2,5	10,0	15,0	5,0	20,0	70,0
34	22,5	7,5	30,0	7,5	2,5	10,0	60,0
35	15,0	5,0	20,0	7,5	2,5	10,0	70,0
36	7,5	2,5	10,0	7,5	2,5	10,0	80,0

Tabela 6: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas através do diagrama ternário.

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristal Líquido
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27		X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		X
35		X	X		X
36				X	X

Após 24 horas de preparo as amostras foram analisadas macro e microscópicamente e a formulação 36 foi mais adequada e caracterizada como O/ A. não apresentou aspecto ceroso, altas concentrações de tensoativos na formulação apresenta aspecto firme (cerosa) do produto; sob luz polarizada apresentou cristal líquido e na microscopia comum apresentou tamanho de glóbulos uniformes. Após a escolha da melhor concentração da fase oleosa, tensoativos e do ponto do diagrama ternário, foi feito o pseudo-diagrama ternário das concentrações dos componentes variando de 5,0 em 5,0% (figura 22) resultando em seis novas formulações, descritas na tabela 7.

Figura 22: Diagrama Pseudo-Ternário (estreitamento do ponto 36).

Tabela 7: Detalhamento das concentrações (%) de tensoativos, óleos e água.

Formulação	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	
I	7,5	2,5	10,0	11,25	3,75	15,0	75,0
II	3,75	1,25	5,0	11,25	3,75	15,0	80,0
III	3,75	1,25	5,0	7,5	2,5	10,0	85,0
IV	7,5	2,5	10,0	3,75	1,25	5,0	85,0
V	11,25	3,75	15,0	3,75	1,25	5,0	80,0
VI	11,25	3,75	15,0	7,5	2,5	10,0	75,0

Tabela 8: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas através do diagrama pseudo-ternário.

Formulação	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristal Líquido
			Polidispersa	Monodispersa	
I	X		X		X
II	X		X		X
III				X	X
IV				X	X
V		X		X	X
VI		X	X		X

Após 24 horas de preparo as formulações foram avaliadas macro e microscopicamente (tabela 8) sendo que a III e IV apresentaram melhor aspecto

macroscópico, sob luz polarizada apresentaram cristais líquidos permanecendo homogêneas comparadas com as demais na análise microscópica. Porém devido à maior concentração de óleo de girassol (7,5%) na formulação apenas a formulação III foi selecionada para sequência da pesquisa.

Após a obtenção de formulações derivadas ao ponto 36 no diagrama pseudo-ternário e selecionarmos a formulação III, observamos que mesmo diminuindo a concentração de tensoativos obtivemos emulsões estáveis com cristais líquidos. Para diminuirmos a concentração de tensoativos nesta formulação adequando a ao uso cosmético mantivemos a concentração de óleos, diminuindo a concentração de tensoativo de 0,5% em 0,5%, conforme esquematizado na figura 23 e tabela 9.

Figura 23: Derivadas da formulação 36- III com concentrações de tensoativos variando de 0,5% em 0,5% no diagrama pseudo-ternário.

Tabela 9: Detalhamento das concentrações (%) de tensoativos, óleos e água.

Formulação	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos[®]	Dermabase[®]	Total	Girassol	Mineral	Total	
0,5	0,38	0,12	0,5	7,5	2,5	10,0	89,5
1,0	0,75	0,25	1,0	7,5	2,5	10,0	89,0
1,5	1,125	0,375	1,5	7,5	2,5	10,0	88,5
2,0	1,5	0,5	2,0	7,5	2,5	10,0	88,0
2,5	1,38	0,62	2,5	7,5	2,5	10,0	87,5
3,0	2,25	0,75	3,0	7,5	2,5	10,0	87,0
3,5	2,63	0,82	3,5	7,5	2,5	10,0	86,5
4,0	3,0	1,0	4,0	7,5	2,5	10,0	86,0
4,5	3,38	1,12	4,5	7,5	2,5	10,0	85,5
5,0	3,75	1,25	5,0	7,5	2,5	10,0	85,0
5,5	4,13	1,37	5,5	7,5	2,5	10,0	84,5
6,0	4,5	1,5	6,0	7,5	2,5	10,0	84,0
6,5	4,88	1,62	6,5	7,5	2,5	10,0	83,5
7,0	5,25	1,75	7,0	7,5	2,5	10,0	83,0
7,5	5,63	1,87	7,5	7,5	2,5	10,0	82,5
8,0	6,0	2,0	8,0	7,5	2,5	10,0	82,0
8,5	6,38	2,12	8,5	7,5	2,5	10,0	81,5
9,0	6,75	2,25	9,0	7,5	2,5	10,0	81,0
9,5	7,13	2,37	9,5	7,5	2,5	10,0	80,5
10,0	7,25	2,75	10,0	7,5	2,5	10,0	80,0

Foram utilizados os mesmo parâmetros das análises anteriores (cerosa, oleosa, dispersão e cristal líquido) para avaliação das formulações. As formulações com concentrações de tensoativos inferiores a 3,5 % apresentaram sinais de instabilidade após 24 horas de preparo como coalescência e cremeação e foram descartadas do estudo, as demais formulações (4,0 a 10,0) apresentaram estáveis macroscopicamente e foram avaliadas microscopicamente e sob luz polarizada. As formulações 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 foram as que apresentaram homogeneidade dos glóbulos e sob luz polarizada apresentaram cristais líquidos conforme apresentado na figura 24 e foram selecionadas para a continuidade dos estudos para o teste de estabilidade preliminar.

Figura 24: Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada das formulações após 24 horas de preparo.

5.2 Estabilidade preliminar

Segundo a ANVISA (2004) o estudo de estabilidade preliminar não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, e sim auxiliar na triagem das formulações.

Tabela 10: Resultados do teste de estabilidade preliminar.

Formulação	Centrifugação (Ciclos)			Estresse Térmico (°C)				Valor de pH/ (Dias)			Condutividade (mS/cm)/ (Dias)		
	I	II	III	55	60	65	70	1	7	15	1	7	15
5,5	N	N	N	N	LM	M	M	3,46	3,57	3,52	244,3	256,2	192,1
6,0	N	N	N	N	N	LM	M	3,48	3,65	3,55	190,8	266,0	223,4
6,5	N	N	N	N	N	LM	M	3,51	3,57	3,56	241,8	253,3	209,3
7,0	N	N	N	N	N	LM	M	3,45	3,52	3,58	233,5	216,2	270,3

Legenda: N: Normal; LM: Levemente modificada; M: Modificada

De acordo com os resultados da tabela 10, as formulações não apresentaram separação de fases no teste de centrifugação, sendo que este pode acelerar a desestabilização simulando o período de validade do produto. Segundo Latreille e Paquin (2006), se a estabilidade é diretamente proporcional à força da gravidade, o comportamento em longo prazo das emulsões pode ser estimado pela centrifugação em velocidades moderadas. Os produtos submetidos ao teste de centrifugação a uma força de gravidade elevada acarretando no processo de coalescência que não ocorre em condições normais de gravidade. No entanto, a partir do momento que mesmo submetida a uma força elevada de gravidade e, as formulações não sofrerem alterações, pode se afirmar que as mesmas seriam estáveis por um longo período de tempo. Porém, o teste de centrifugação é indicativo de estabilidade, mas deve estar associados a outros testes como estresse térmico e estabilidade acelerada. (TADROS, 2007).

Todas as formulações permaneceram homogêneas após o teste de estresse térmico, permanecendo estáveis até 60°C e a partir deste valor de temperatura apresentaram leves modificações coalescendo a partir de 70°C. De acordo com Santos (2007) o estresse térmico é uma técnica onde estudam as propriedades físico químicas em função da temperatura à qual as formulações foram submetidas.

Os valores de pH em todas as formulações apresentaram-se com caráter ácido. Podemos associar os valores de pH ácido à utilização da base auto-emulsionante Crodafos[®] que de acordo com o boletim técnico da Croda (2010) o valor de pH desta está em torno de 3,1. Os valores de condutividade elétrica apresentaram-se altos devido à utilização de tensoativos iônicos comparado a formulações com tensoativos não iônicos e indica que a fase externa é aquosa, confirmando que as emulsões são do tipo O/A.

5.3 Estabilidade acelerada

De modo geral avaliam-se características organolépticas (aspecto, odor, cor), características físico-químicas como: valores de pH, condutividade e reologia (ANVISA, 2004).

Para ser considerada apropriada para uso cosmético as emulsões foram submetidas aos testes de estabilidade prolongada sob condições determinadas de armazenamento por um período de 90 dias (OLIVEIRA, 2010). Os testes de estabilidade acelerada de armazenamento para formulações de produtos cosméticos podem prever a estabilidade física de longo prazo, bem como mudança de consistência em função do tempo (TADROS, 2007).

Nas diferentes condições de armazenamento dentre as formulações selecionadas (5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) apresentaram sinais de instabilidade as formulações 5,5 e 6,0 como cremeação e coalescência a partir do 60º dia de análise, portanto, foram reprovadas. Após realização dos testes de estabilidade das formulações sem aditivação, as mesmas foram submetidas ao mesmo teste aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol, para avaliar se adição do extrato influenciava nos valores de pH, condutividade elétrica e comportamento reológico comparado as formulações sem aditivação.

5.3.1 Valores de pH

A análise dos valores de pH visa investigar alterações que têm origem intrínseca na estabilidade da formulação, ou seja, determinadas por fatores inerentes à mesma. A variação destes valores pode indicar ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final (ROLAND, 2003; ANVISA, 2004).

Os ácidos graxos insaturados são os compostos lipídicos mais susceptíveis ao processo oxidativo. Estas reações oxidativas são responsáveis pelo desenvolvimento de odores desagradáveis e outras alterações que comprometem a integridade e segurança dos produtos tornando-os impróprios para consumo (RAMALHO, 2006). Formulações compostas por matérias primas vegetais com alto teor em ácidos graxos como as analisadas nesta pesquisa são, portanto, muito suscetíveis às reações oxidativas como a hidrólise, podendo alterar os valores de pH (ANDRADE, 2008).

Para as formulações analisadas os valores de pH mantiveram sem grande variação os mesmos, sendo que apenas a amostra 6,5 com e sem aditivação armazenada a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentou uma diferença estatisticamente significativa no trigésimo dia de análise (figuras

25 e 26). As demais amostras mantiveram o valor pH com mínima variação nos 90 dias de análise.

Figura 25: Valores de pH das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Figura 26: Valores de pH das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada (n=3)

Comparando as formulações estudadas os valores de pH apresentaram-se de caráter ácido, sendo que para as formulações mantidas em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ observou-se mínima variação durante o teste de estabilidade acelerada, enquanto que as formulações mantidas à temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentaram variações estatisticamente significantes. Essa diminuição do valor de pH pode ser decorrente de hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, presentes nos óleos, que conduz à geração de ácidos graxos livres e podem reduzir o valor de pH (MASMOUDI, 2005). As formulações aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol manteve a mesma característica das formulações sem aditivação. Estes resultados estão de acordo com trabalhos de Andrade (2008) que também utilizou a base auto-emulsionante a base de éster fosfórico e óleo de andiroba demonstrando o caráter ácido da base fosfórica.

5.3.2 Condutividade elétrica

Como pode ser observado nas figuras 27 e 28, a condutividade elétrica inicialmente mantém-se para todas as emulsões, e então aumenta para as amostras expostas a $40\pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Para as formulações armazenadas em $5\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, a condutividade permanece constante sem alterações estatisticamente significativa. As formulações aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol apresentaram valores menores de condutividade quando comparadas com as formulações não aditivadas, podendo ser consideradas mais estáveis. De acordo com a ANVISA (2004) o aumento da condutividade elétrica está associado a fatores de instabilidade das formulações.

Figura 27: Valores de condutividade elétrica das amostras 6,5 e 7,0 durante o teste de estabilidade acelerada (n=3)

Figura 28: Valores de condutividade elétrica das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

O aumento da condutividade elétrica das formulações submetidas à temperatura de armazenamento de $40\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ pode estar relacionado com a coalescência; enquanto a diminuição, com agregação (ANVISA, 2004) comparada com as mesmas formulações armazenadas na temperatura de $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e $5\pm 2,0^{\circ}\text{C}$. De acordo com Andrade (2008) o armazenamento das formulações em altas temperaturas tende a diminuir a consistência do

sistema e aumentar o conteúdo de água livre o que foi comprovado com os estudos de reologia (item 5.4), com a redução nos valores de viscosidade nas formulações armazenadas em $40\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ causando o aumento da condutividade elétrica do sistema. Masmoudi *et al.* (2005) afirmam que geralmente, quando uma emulsão é estável, nenhuma modificação na condutividade é observada. No entanto, esses autores apresentam emulsões estáveis armazenadas a 50°C para as quais o valor de condutividade aumenta apesar de não ser observada desestabilização em escala macroscópica. Nossas formulações também não apresentaram sinais de instabilidade como cremação nas amostras armazenadas na estufa. De fato, Masmoudi *et al.* (2005) afirmam que emulsões que têm altos valores de condutividade elétrica tendem a ser mais instáveis, e isso está de acordo com nossos resultados.

5.3.3 Análise microscópica sob luz polarizada

A presença das estruturas lamelares mesmo após o armazenamento em temperatura mais elevada ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$) pode ser explicada pelo fato dessas estruturas serem capazes de armazenar água livre entre suas lamelas, processo que ocorre durante o preparo da formulação e é mantida pelo período de armazenamento (OLIVEIRA, 2010). Estruturas lamelares tem maior poder hidratante comparada a formulações sem cristal líquido, essa hidratação relativa maior deve-se à água livre armazenada entre as lamelas (ECCLESTON, 2000). Nas fotomicrografias obtidas durante avaliação microscópica é possível observar a manutenção das estruturas lamelares anisotrópicas em todas as formulações no período de 90 dias em condições extremas de armazenamento. É possível observar que nas amostras aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol (figuras: 31 e 32) apresentaram melhores estruturas lamelares comparando as formulações sem aditivação (figuras: 29 e 30), a adição do extrato auxiliou na manutenção do cristal líquido.

Figura 29: Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 6,5 sem aditivção em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias das formulações.

Figura 30: Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 7,0 sem aditivção em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias das formulações.

Figura 31: Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada da formulação 6,5 aditivada com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias das formulações.

Figura 32: Fotomicrografias (200x) sob luz polarizada das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol em diversas condições de armazenamento após 24 horas e 90 dias das formulações.

5.4 Propriedades reológicas

A partir do estudo das propriedades reológicas de uma emulsão, pode-se determinar a estabilidade física do sistema (SORIANO, 2001). As propriedades de fluxo são características físicas determinantes para o equilíbrio do sistema disperso, pois fornecem informações sobre estabilidade física e consistência do produto. A correlação entre a avaliação reológica e estes aspectos físicos e de aceitação comercial é de grande importância na predição do desempenho e no desenvolvimento de novos produtos (TADROS, 2004).

O comportamento reológico de uma emulsão depende da interação entre os componentes do sistema. Os parâmetros básicos que o determinam são: reologia da fase contínua, natureza das partículas da fase dispersa (tamanho, concentração) e as interações entre elas (BARNES, 1994).

Por meio de caracterização reológica é possível determinar se um produto apresenta fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano. Fluidos Newtonianos obedecem à lei de Newton que estabelece que a velocidade do fluxo é diretamente proporcional à tensão aplicada, portanto, a viscosidade independe da taxa de cisalhamento. Geralmente o comportamento Newtoniano é observado em soluções de moléculas com baixo peso molecular e soluções diluídas (OLIVEIRA, 2010).

Sistemas emulsionados geralmente apresentam fluxo não-Newtoniano. Nestes, a viscosidade depende da taxa de cisalhamento, ou seja, diferentes valores de viscosidade podem ser obtidos de acordo com a variação da velocidade e da força aplicada em função do tempo. Este comportamento se deve a desvios considerados nos estudos da lei de Newton. São conhecidos três tipos diferentes de comportamento não-Newtoniano dependendo do tipo de desvio: fluxo plástico, fluxo pseudo-plástico e fluxo dilatante, estes fluxos apresentando ou não tixotropia (BARNES, 1994).

Para produtos cosméticos o comportamento de fluxo pseudo-plástico é o mais interessante, caracterizado pela diminuição da resistência do produto ao cisalhamento (escoamento) aplicado indicando espalhamento adequado e boa cobertura do produto sobre a pele (BOODTS, 2003). Materiais que apresentam este comportamento mostram uma diminuição da resistência ao escoamento à medida que se eleva a taxa de cisalhamento. A viscosidade diminui com o aumento da velocidade de deformação. Esta diminuição da viscosidade é reversível quando diminuída ou cessada a taxa de cisalhamento (GAO, 2003).

As formulações expostas a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ foram analisadas em função dos diferentes tempos de armazenamento: 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após o preparo. De acordo com os reogramas (Figuras: 33 e 34) todas as formulações apresentaram curvas ascendentes superior a descendente caracterizando emulsões tixotrópicas que é ideal para formulações cosméticas.

Figura 33: Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação em diversas condições de armazenamento (n=3).

Figura 34: Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% extrato glicólico de polifenóis de girassol (n=3).

Observamos uma redução da tensão de cisalhamento e da área de histerese (área formada pelas curvas ascendente e descendentes) nas formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação e nas formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol armazenadas na temperatura $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ao longo do teste de estabilidade acelerada, mas não apresentou sinais de instabilidade como coalescência.

O índice de consistência apresentou constante para as formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação (figura 35) e as formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol (figura 36) armazenadas a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ indicando que a formulação é estável. Todas as formulações não aditivadas e aditivadas armazenadas a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentaram alterações estatisticamente significativa comparada ao tempo zero (t_0). Correlacionamos nossos resultados com os resultados obtidos por Andrade (2008) os resultados obtidos foram semelhantes, a diminuição da consistência deve se ao armazenamento das formulações em altas temperaturas.

Figura 35: Índice de consistência das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Figura 36: Índice de consistência das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

A pseudoplastia pode ser observada tanto pela característica dos reogramas quanto pelo valores de índice de fluxo. O índice de fluxo de uma formulação é indicativo do comportamento de fluxo: quanto for igual a 1,0, a formulação apresenta comportamento de fluxo Newtoniano; valores abaixo de 1,0 caracterizam comportamento pseudoplástico, que aumenta à medida que diminui o valor do índice de fluxo; e valores acima de 1,0 caracterizam comportamento dilatante (SANTOS, 2006).

Em relação ao índice de fluxo as formulações armazenadas a $5\pm 2^\circ\text{C}$ mantiveram se estáveis ao longo do teste, as formulações mantidas a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e a $40\pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram uma alteração estatisticamente significativa, todas as formulações mantidas na temperatura $40\pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram um aumento no índice de fluxo (figuras 37 e 38), mas mantiveram com índice de fluxo abaixo de 1,0 mantendo assim a pseudoplasticidade. Nossos resultados de índice de fluxo foram semelhantes ao trabalho de Andrade (2007) com emulsões cosméticas O/A contendo cristais líquidos.

Figura 37: Índice de fluxo das formulações 6,5 e 7,0 não aditivadas durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Figura 38: Índice de fluxo das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

As formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação (Figura: 39) e as formulações 6,5 e 7,0 (Figura: 40) aditivadas com extrato glicólico de polifenóis armazenadas em temperatura $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentaram melhor perfil tixotrópico embora tenham apresentado algumas alterações estatisticamente significativas mantiveram se estáveis. As formulações sem aditivação e aditivadas armazenadas em temperatura $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentaram alterações estatisticamente significativas a partir do trigésimo dia de análises.

Figura 39: Tixotropia das formulações 6,5 e 7,0 sem aditivação durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Figura 40: Tixotropia das formulações 6,5 e 7,0 aditivadas com 1% de extrato glicólico de polifenóis de girassol durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pela área de histerese formada entre as curvas, ascendente e descendente, de um reograma (PIANOVSKI, 2008). É evidenciada quando a curva ascendente está posicionada acima da curva descendente e a reopexia quando a curva descendente é superior. Para a cosmética é interessante formulações com caráter tixotrópico, pois se deformam durante a aplicação e tornam-se mais fluidas facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra (LEONARDI, 2004).

O grau de tixotropia da formulação fornece informações da capacidade e do tempo que o produto apresenta em retornar à sua estrutura após a aplicação de tensão. O comportamento tixotrópico é interessante tanto na tecnologia farmacêutica como na de cosméticos, pois formulações que apresentam esta característica, durante a aplicação tópica tornam-se mais fluídas, facilitando o espalhamento e recuperam a viscosidade ou parte dela, como termino da tensão evitando assim que o produto flua (FERRARI, 2002)

5.5 Avaliação *in vitro* da atividade doadora de H⁺ do óleo de girassol ao DPPH•

O radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•), é caracterizado como estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula (Figura 41 A). Por isso não dimeriza como seria o caso para a maioria dos radicais livres. A deslocalização eletrônica é também responsável pela sua cor violeta característica. Quando uma solução etanólica de DPPH• é misturada com uma ou mais substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio, a molécula de DPPH• apresenta-se na forma reduzida (Figura 41 B) com perda da coloração violeta e aparecimento de uma cor residual amarela devido à presença do grupo picril (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004; NIKI, 2010).

Figura 41: (A) radical difenilpicrilhidrazila e (B) molécula difenilpicrilhidrazina.

Os óleos vegetais são substâncias ricas em compostos fenólicos, funções orgânicas caracterizados por uma hidroxila ligada a um anel aromático. Esses compostos são doadores de elétrons uma vez que seu grupo hidroxila tem alta atividade de propagação do processo oxidativo. Por outro lado, os produtos intermediários formados pela ação desses antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (DENG, CHENG, YANG, 2001).

Para muitos óleos vegetais o aquecimento à temperatura de $75\pm 2^{\circ}\text{C}$ no processo de emulsificação pode causar perda das propriedades como alguns óleos essenciais ricos em terpenos. Realizamos o teste de DPPH• com óleo de girassol sem aquecimento (figura 42), e com aquecimento à temperatura de emulsificação a $75\pm 2^{\circ}\text{C}$ e mantido em repouso por 24 horas para atingir a temperatura ambiente e, posteriormente aplicar o teste da atividade doadora de H^+ ao DPPH• (figura 43).

Figura 42: Determinação da atividade doadora de H^+ do óleo de girassol ao radical DPPH•

Figura 43: Determinação da atividade doadora de H^+ do óleo de girassol aquecido $75 \pm 2^\circ C$ ao radical DPPH•

Segundo Bandoniene (2002), o valor de IC_{50} expressa a quantidade da matéria prima antioxidante necessária para diminuir a absorbância do DPPH• em 50%, inibição de 50% do radical DPPH•. O óleo de girassol apresentou IC_{50} de $6,81 \mu L/mL$, ou seja, $6,81 \mu L/mL$ do óleo de girassol inibe 50% da atividade do DPPH• enquanto que após o aquecimento o valor de IC_{50} é de $6,79 \mu L/mL$, ou seja, $6,79 \mu L/mL$ do óleo de girassol aquecido inibe 50% da atividade do DPPH•. Comparando a atividade doadora de H^+ do óleo de girassol e do óleo de girassol aquecido, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na atividade doadora de H^+ do óleo de girassol, portanto, a submissão do óleo de girassol a altas temperatura para o processo de emulsificação não influencia nas propriedades antioxidantes. Comparando nossos resultados com os resultados Maruno (2009) que fez avaliação da atividade antioxidante do óleo de gergelim e do óleo de framboesa pelo mesmo método, verificamos que o óleo de gergelim apresentou um IC_{50} de $310,94 \mu L/mL$, ou seja, o óleo de girassol apresenta uma atividade antioxidante 45 vezes maior que o óleo de gergelim, o óleo de framboesa apresentou IC_{50} de $34 \mu L/mL$, ou seja, o óleo de girassol apresenta uma atividade antioxidante 5 vezes maior que o óleo de framboesa. Correlacionamos esta atividade antioxidante do óleo de girassol à alta porcentagem de vitamina E em sua composição (RAHETE *et al.*, 2007).

5.6 Influência da adição de ésteres na formação e manutenção dos cristais líquidos

A formulação 7,0 sem aditivação foi selecionada para o estudo da influência da adição de ésteres graxos na formação e manutenção dos cristais líquidos. Os ésteres graxos de cadeias retas e de cadeias ramificadas testados são amplamente utilizados em produtos cosméticos. A concentração dos ésteres usada em nossas formulações foi de 1%, testados separadamente.

Foi realizado um teste preliminar (foram manipuladas as formulações e avaliadas 24 horas após o preparo) para avaliar a influência dos ésteres graxos na formação e manutenção do cristal líquido com os seguintes ésteres graxos: Alquil benzoato, Caprílico Trglicerídeos, Estearato de Octila, Éster Cetílico, Lactato de Cetila, Miristato de Isopropila, Palmitato de Cetila, Palmitato Etoílico, Lactato láurico, Miristato Benzílico e PPG-3 Miristato Eter Benzílico.

Após 24 horas do preparo das formulações foi realizada a análise microscópica sob luz polarizada para verificar quais ésteres que não influenciaram na formação do cristal líquido. Alquil Benzoato, Lauril Lactato, Miristato Benzílico, PPG-3 Miristato Eter Benzílico e palmitato etoxílico influenciaram na formação dos cristais líquidos. Segundo Eccleston (2000) e Santos (2006) a formação do cristal líquido depende da interação das moléculas anfifílicas dos tensoativos e água. Quando o tensoativo e a água são submetidos a um aumento na temperatura, as cadeias lipofílicas rearranjam-se em um estado líquido desordenado e a água penetra entre as cadeias hidrofílicas. Após o arrefecimento as cadeias hidrofílicas se reorganizam e mantêm a água entre si, formando assim o cristal líquido ou fase gel. Provavelmente houve uma interação entre as cadeias carbônica dos tensoativos com as cadeias carbônicas dos ésteres Alquil Benzoato, Lauril Lactato, Miristato Benzílico e PPG-3 Miristato Eter Benzílico no processo de emulsificação e quando o sistema arrefeceu as cadeias carbônicas dos tensoativos se reorganizaram, mas não mantiveram a água entre as lamelas não proporcionando a formação de cristais líquidos.

Os ésteres Caprílico Trglicerídeos, Estearato de Octila, Éster Cetílico, Lactato de Cetila, Miristato de Isopropila e Palmitato de Cetila que não influenciaram preliminarmente foram selecionados para continuidade dos estudos.

As formulações aditivadas com 1% de éster graxo foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada: valores de pH, condutividade elétrica, comportamento reológico quando submetidos à temperaturas extremas de armazenamentos para avaliar a influência do éster graxo adicionado na formulação na manutenção dos cristais líquidos,

5.6.1 Valores de pH

Os valores de pH das formulações aditivadas com ésteres graxos apresentaram diferenças estatisticamente significativas para todos os ésteres testados. As formulações contendo éster cetílico e miristato de isopropila apresentaram melhor desempenho comparada com as demais enquanto os ésteres graxos caprilico triglicerídeos, estearato de octila e lactato de cetila apresentaram maiores diferenças estatisticamente significativas e menor estabilidade frente os valores de pH. Considerando que as formulações foram submetidas a condições extremas de armazenamentos, supõe-se que as emulsões aditivadas com ésteres graxos tiveram bom desempenho em relação aos valores de pH (figura 44). Comparando as formulações aditivadas com ésteres graxos com a formulação 7 sem aditivação, obtivemos resultados semelhantes nos valores de pH, o que nos leva a concluir que os ésteres graxos não influenciaram no valores de pH das formulações.

Figura 44: Valores de pH das formulações aditivadas com 1% éster durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

5.6.2 Condutividade elétrica

Com relação ao estudo de condutividade elétrica, todas as formulações apresentam diminuição nos valores de condutividade elétrica, com exceção à formulação aditivada com caprílico triglicerídeos armazenada a $40\pm 2^\circ\text{C}$ (figura 45) que apresenta aumento significativo na condutividade elétrica. Segundo o Guia de Estabilidade de Cosméticos da ANVISA (2004) o aumento na condutividade pode ser caracterizado como sinal de instabilidade do sistema, porém não observado nesta formulação. Os ésteres palmitato de cetila e o éster cetílico apresentaram melhores valores de condutividade elétrica durante o teste de estabilidade. Comparando com a formulação 7,0 sem aditivação com as formulações aditivadas com ésteres graxos, as formulações aditivadas com ésteres graxos apresentaram condutividade menor que a formulação 7,0 sem aditivação, ou seja, as formulações aditivadas têm maior estabilidade em relação as não aditivadas. Portanto, os ésteres graxos em formulações cosméticas podem aumentar a estabilidade física das formulações,

Figura 45 Condutividade elétrica das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

5.6.3 Análise microscópica sob luz polarizada

As formulações aditivadas com éster graxos foram submetidas à análise microscópica sob luz polarizada 1 dia após o preparo das formulações e a 90 dias após o preparo e armazenadas condições extremas de armazenamentos: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40\pm 2^{\circ}\text{C}$. Conforme ilustra a figura 46.

Figura 46: Fotomicrografias (200X) sob luz polarizada das formulações aditivadas com 1% de éster (1- miristato de isopropila, 2- lactato de cetila, 3 – caprilicos triglicerídeos, 4 – éster cetílico, 5 – estearato de octila, 6 – palmitato de cetila) armazenadas em diversas condições de armazenamento durante o teste de estabilidade acelerada.

A formulação contendo o éster lactato de cetila e caprico triglicerídeos apresentou uma diminuição na estruturas lamelares na temperatura de armazenamento de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ no último dia de teste, porém ainda apresentaram cristais líquidos em menores intensidade. Já

as formulações aditivadas com palmitato de cetila e éster cetílico apresentaram um aumento de estruturas anisotrópicas, porém houve uma deformação dos cristais líquidos em todas as temperaturas de armazenamento. As formulações contendo miristato de isopropila e estearato de octila mantiveram as mesmas estruturas líquido cristalinas em menor intensidade comparadas ao primeiro dia de teste. Mas consideramos que todas as formulações aditivadas com ésteres graxos mantiveram as estruturas cristalinas no período de 90 dias comparando com a formulação 7,0 sem aditivação observamos o mesmo perfil de estruturas líquido cristalinas

5.6.4 Comportamento reológico

As formulações aditivadas com ésteres graxo foram submetidas à avaliação do comportamento reológico para análise da influência dos mesmos no perfil reológico das formulações durante o teste de estabilidade acelerada.

De acordo com os reogramas todas as formulações aditivadas com ésteres graxos (figura 47) apresentaram características tixotrópicas que é ideal para formulações cosméticas. Observamos uma redução da tensão de cisalhamento e da área de histerese nas formulações armazenadas na temperatura $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ para o tempo de 90 dias, porém, ausência de sinais de instabilidade como coalescência ou cremeação. Essa redução da área de histerese se deve ao stress da formulação submetida em altas temperaturas por longo período de tempo. Comparando os reogramas das formulações aditivadas com ésteres graxos com o reograma da formulação 7,0 sem aditivação (figura 33) obtivemos resultados semelhantes.

Figura 47: Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada das formulações aditivadas com 1% de éster graxos em diversas condições de armazenamento (n=3).

Com relação às análises de índice de consistência as formulações armazenadas em altas temperaturas ($40\pm 2^\circ\text{C}$) apresentaram diferenças estatisticamente significantes. As formulações armazenadas nas demais condições de armazenamento apresentaram índice de fluxo constante, evidenciando ótima estabilidade do sistema com relação a este parâmetro (figura 48).

Figura 48: Índice de consistência das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Com relação ao índice de fluxo, podemos perceber que na condição de armazenamento de $40\pm 2^\circ\text{C}$ (estufa) e a formulação aditivada com lactato de cetila na condição de armazenamento $5\pm 2^\circ\text{C}$ (geladeira) apresentaram diferenças estatisticamente significantes durante o período analisado (figura 49). Comparando com as demais condições, podemos considerar uma ótima estabilidade com relação a esse parâmetro, pois mesmos as formulações submetidas a altas temperaturas mantiveram-se com índice de fluxo menor que um, indicando que o sistema permaneceu com fluxo pseudo-plástico.

Figura 49: Índice de fluxo das formulações aditivadas com 1% éster durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

Com relação ao parâmetro tixotropia as formulações mantidas a 5±2°C (geladeira) apresentaram maior estabilidade comparadas às demais condições de armazenamento 25±2°C e 40±2°C que apresentaram diferenças estatisticamente significantes. As formulações armazenadas a 40±2°C apresentaram maior queda na tixotropia, o que significa uma diminuição da viscosidade (figura 50). Comparada com a formulação 7,0 sem aditivação (figura 39) obtivemos perfis tixotrópicos semelhantes, porém as formulações aditivadas com ésteres apresentaram maior tixotropia, ou seja, os ésteres adicionados nas formulações aumentam a viscosidade do sistema. De acordo com Gorcea e Laura (2010) os ésteres graxos são doadores de viscosidade. Consideramos bom desempenho das formulações nesse parâmetro, mesmo a formulações submetidas ao um estresse maior manteve se com comportamento tixotrópico, fluxo ideal para produtos tópicos.

Figura 50: Tixotropia das formulações aditivadas com 1% de éster durante o teste de estabilidade acelerada (n=3).

5.7 Avaliação *in vivo* do potencial hidratante, oleosidade, valor de pH cutâneo e Irritação

5.7.1 Avaliação do potencial hidratante

Na pele existe uma grande diferença entre a parte interna dos tecidos ricos em água e o ambiente relativamente seco do lado externo do corpo e, o estrato córneo é a principal barreira contra a perda de água transepidérmica. Isto explica porque a hidratação da pele está intrinsicamente relacionada com a integridade do estrato córneo (PROKSCH, 2005).

O grau de hidratação do estrato córneo pode ser avaliado por métodos simples, rápidos e não invasivos empregando propriedade elétricas e dielétricas da pele. O método aplicado *in vivo* avalia a capacitância da pele e proporciona um perfil cinético da hidratação em função do tempo (OLIVEIRA, 2010).

Dentre todas as formulações, a que apresentou melhor atividade hidratante foi a formulação aditivada com éster graxo miristato de isopropila, embora as demais também apresentem ótima atividade hidratante (figura 51). Comparando nossas formulações com as formulações comerciais, observamos valores superiores de hidratação relativa para as formulações comerciais, justificados pela presença de componentes umectantes existentes nas formulações, como glicerina, propilenoglicol e a utilização de mais de um éster graxo em uma mesma formulação componentes estes ausentes em nossas formulações.

Figura 51: Gráfico representando o resultado da avaliação do potencial hidratante das formulações.

Comparando os resultados obtidos com de Oliveira (2010) e de Oliveira e Boock (2011), que desenvolveram emulsões com cristais líquidos e manteigas vegetais, obtivemos resultados semelhantes de hidratação relativa ao tempo inicial do teste. Com o transcorrer

do teste a atividade da hidratação relativa diminui e nossas formulações mantiveram constante a hidratação relativa da pele. Acreditamos que as bases auto-emulsionantes utilizadas em nosso estudo tenham maior poder hidratante, pois em suas composições além de tensoativos, uma delas é mistura de óleos e manteigas vegetais, comparada os tensoativos utilizados por Oliveira (2010).

A manutenção da atividade hidratante também pode ser atribuída à presença de cristais líquidos: as estruturas lamelares devido ao armazenamento de água entre suas multicamadas, promove aumento da capacidade hidratante da formulação podendo ser considerada como um “hidratação prolongada” (ECCLESTON, 1988; ENGELS & RYBINSKI, 1998; RIBEIRO, 2004; OLIVEIRA 2010).

5.7.2 Avaliação da oleosidade cutânea

Nos resultados (figura 52) é possível observar que as formulações tiveram aumento considerável na oleosidade após o uso do produto. Comparando o tempo inicial (t0) após 30 minutos de início do teste (t30) observamos aumento nos valores de oleosidade cutânea, seguido de decréscimo após 30 minutos (t60) provavelmente as formulações foram absorvidas pela pele. A região controle não demonstrou mudanças nos valores de oleosidade, provavelmente isso ocorre porque o teste foi realizado em uma sala climatizada, onde a temperatura e umidade são controladas, não favorecendo as glândulas sebáceas produzissem mais secreções.

Figura 52: Gráfico do resultado da avaliação da oleosidade cutânea das formulações.

Todas as formulações apresentaram resultados semelhantes, exceto a formulação comercial II que apresentou oleosidade menor comparada às demais, acreditamos que em sua composição exista menor quantidade de materiais graxos.

5.7.3 Avaliação dos valores de pH cutâneo

Quando saudável o estrato córneo apresenta valor de pH ácido em torno de 5,5. Este manto ácido pode ser gerado por diversos fatores, como: metabolismo superficial de microrganismos; ácidos graxos e derivados do sebo; hidrolises na epiderme. Exerce um efeito protetor contra bactérias e fungos e é essencial para a saúde cutânea (SANTOS, 2005). O controle do pH cutâneo é de extrema necessidade para evitar o uso de produtos inadequados, que possam comprometer as funções da pele (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Na figura 53 pode se observar que os valores de pH cutâneos tanto para as formulações desenvolvidas, formulações comerciais e a região controle mantiveram se dentro do considerado ideal para pele humana. Nenhuma das formulações apresentou variações estatisticamente significantes.

Figura 53: Gráfico do resultado da avaliação dos valores de pH cutâneo das formulações.

5.7.4 Avaliação do potencial irritante

Eritema ou pele avermelhada representam os primeiros sinais de reação inflamatória causada pelo contato da pele com substâncias irritantes. A percepção da mudança de coloração da pele devido à inflamação é muito subjetiva, podendo ser influenciada por processos de descamação e pigmentação (ALEWAETERS, 2000; DARLENSKI, 2008). O parâmetro utilizado para avaliação foi o a^* (parâmetro para avaliação da vermelhidão) verde para o vermelho (figura 54).

Figura 54: Gráfico do resultado da avaliação irritação cutâneo (a^*) das formulações

Nossos resultados foram semelhantes ao de Pereira (2011) que utilizou esse mesmo parâmetro de avaliação de nanoemulsões cosméticas contendo os óleo de framboesa, maracujá e pêssago. Os resultados obtidos de variação de cor (parâmetro a^*) foram submetidos à análise estatística e não apresentaram diferenças significativas, ou seja, as formulações testadas não promoveram vermelhidão na pele durante o período do teste, portanto, não são irritantes a pele.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, concluímos que:

- ✓ Os sistemas emulsionados constituídos de óleo de girassol, óleo mineral, tensoativos aniônicos e não iônicos foram estáveis e apresentaram estruturas lamelares durante o teste de estabilidade acelerada.
- ✓ As formulações aditivadas com extrato glicólico de polifenóis de girassol apresentaram estáveis durante o teste de estabilidade acelerada, e a adição do extrato não influenciou na manutenção dos cristais líquidos.
- ✓ Todas as formulações desenvolvidas e avaliadas apresentaram fluxo não Newtoniano, pseudo-plásticas e tixotrópicas.
- ✓ O óleo de girassol demonstrou atividade antioxidante mantida após aquecimento da fase oleosa para o processo de emulsificação.
- ✓ A cadeia carbônica de alguns ésteres graxos pode influenciar na formação e manutenção dos cristais líquidos e não interfere nos valores de pH, condutividade elétrica e comportamento reológico.
- ✓ As emulsões desenvolvidas quando aplicada nos voluntários, promoveu alta hidratação relativa na pele, não alterando o valor de pH e oleosidade cutâneos.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

AL-BAWAB, A.; FRIBERG, S.E. Amphiphilic association structures in a model skin lotion with hydroxy acids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, p. 139-147, 2004.

ALEWARTERS, P.C.K.; LAMBRECHT, R.; BAREL, A.O. Skin color measurements: comparison between three instruments: the chromameter, the dermaspectrometer and the mexameter. **Skin Research and Technology**, v. 6, p. 230-238, 2000.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Troletries** (edição em português), v. 15, n. 3, p. 96-100, 2003.

ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Influence of PEG-12 Dimethicone addition on stability and formation of emulsion containing liquid crystal. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 211 – 218, 2007.

ANDRADE, F.F. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ANVISA. GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas. Série Qualidade 1**, v. 1, maio de 2004.

AUVRAX, X.; PETIPAS, C.; LATTES, A.; RICO-LATTES, I. Role of solvent-head-group interaction on the formation of lyotropic liquid-crystals in structured non-aqueous solvent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123-124, p. 247-251, 1997.

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

BARNES, H. A. Rheology of emulsions – a review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 89-95, 1994.

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

BECHTOLD, I.H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.27, n.3, 2005.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, n. 2, p. 143-145, 1958.

BOOCK, K.P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*)**. 2007. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

BOODTS, J. B. **Estabilidade química e física de formulações dermocosméticas contendo retinaldeído**. 2003. 123 f.. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2003.

BOWSERT, P.A.; HARDING, C.R.; RAWLING, A. V.; SCOTT, I.R. Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, p. 731-739, 1994.

BRACONI, F.L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M.N.F.; ROCHA FILHO, P.A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos, São Paulo, 1995, ANAIS. São Paulo, **Associação Brasileira de Cosmetologia**, 6-19, 1995.

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, 1999.

CHIOU, A.; SALTA, F. N.; KALOGERIPOULOS, N.; MYLONA, A.; NTALLA, I.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Retention and Distribution of Polyphenols after Pan-frying of Fernch Fries in oils. *Sensory and Nutritive Qualities of Foods*, v. 72, n. 8m 2007.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid crystals and cosmetics applications. **Cosmetics and Toiletries**, v.105, p. 57-62, 1990.

COURAGE + KHAZAKA. **Sebumeter® SM 810; Cornemeter® CM 820; Skin pH-meter® P900** – Information and Operating Instruction (catálogo).

CRODA® – **Informe técnico da Croda do Brasil**: Catálogo, 2011.

DARLENSKI, R.; ANGELOVA-FISCHER, L.; TSANKOV, N.; BASKETTER, D. Skin irritation and sensitization: Mechanisms and new approaches for risk assessment. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 124-135, 2008.

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

DAVIS, H. M. Analysis of creams and lotions. In: SENZEL, A. J. (ed.) **NEWBURGER'S MANUAL OF COSMETIC ANALYSIS**, Washington, **Association of Official Analytical Chemists**, cap. 4, p. 32, 1997.

DAVIS, S. S.; BRUBAGE, A. S. Electron micrography of water-in-oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 62, p. 361-363, 1997.

DENG, J.D.; CHENG, W.; YANG, E. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1430-1435, 2011.

DIABAO, S. N. C. Estudo de Parâmetros de Estabilidade de Emulsões Cosméticas, **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 31, p. 50-55, 2009.

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

ECCLESTON, G. M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes dermatological lotion and creams. **Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, n. 123-124, p. 161-182, 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 cetolstearyl alcohol/polyoxyethylene alkyl ether surfactants. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 15-17, p. 2499-2518, 1988.

ECLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces**, v. 123-124, p. 169-182, 1997.

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

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

FIGUEIREDO, K. C. Géis de quitosana para liberação prolongada intrabolsa periodontal de metronidazol para o tratamento da periodontite. Ribeirão Preto, 177f. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. In: **Plantas Florianópolis: UFSC**, p. 489-573, 1999.

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

FORTER, T.; JACKWERTH, B.; PITTERMAN, W.; VON-RYBUNSKI, W.; SCMITT, M. Properties of emulsions – structure and skin penetration. **Cosmetics & Toiletries**, v. 112, p. 73-82, 1997.

FREDRICK, E.; WALSTRA, P.; DEWETTINCK, K. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 153, p. 30-42, 2010.

FRIBERG, S. E. Theory of emulsions. In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987.

FRIBERG, S.E.; HUANG, T.; AIKENS, P.A. Phase changing during evaporation from a vegetable oil emulsion stabilized by a polyoxyethylene (20) sorbitanoleate, Tween 80. **Colloid and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 121, p. 1-7, 1997.

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. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GONÇALVES, R. A. **Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. 2000. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

GORCEA, M.; LAURA, D. Evaluating the physic-chemical properties of emollient esters for cosmetic use. **Cosmetic & Toiletries**, v. 25, n. 12, p. 26-33, 2010.

GUEVARA, I.L.; PANDYA, A. G. Safety and efficacy of 4% hydroquinone combined with 10% glycolic acid, antioxidants, and sunscreen in the treatment of melasma. **International Journal of Dermatology**. v. 42, p.966-972, 2003.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free radical biology & Medicine**, v. 46, p. 531-542, 2005.

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

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

KÓNYA, M.; DÉKÁNY, I.; ERŐS, I. X-ray investigations of the role of the mixed emulsifier in the structure formation o/w creams. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 657-663, 2007.

KÓNYA, M.; SORRENTI, M.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; CSÓKA, I.; CARAMELLA, C.; BETTINETTI, G.; EROS, I. Study of the microstructure of oil/water creams with thermal and rheological methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, p. 623-632, 2003.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BANANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**. v. 113, p. 71-88, 2002.

KUNIEDA, H.; KABIR, H.; ARAMAKI, K.; SHIGETA, K. Phase behavior of mixed polyoxyethylene-type nonionic surfactant. **Journal of Molecular Liquids**, v. 90, p. 157-166, 2001.

KUNIEDA, H.; UMIZO, G.; YAMAGUCHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the liquid crystalline structures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 88-96, 1999.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P.. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1666-1668, 2006.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. Medfarma, 1 ed. P. 56-57, 2004.

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

LONZA®. DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate. **Informe técnico**. 2010.

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

MALAFA, M.P.; FOKUM, F. D.; SMITH, L.; LOUIS, A. Inhibition of angiogenesis and promotion of melanoma dormancy by vitamin E succinate. **Annals of Surgical Oncology**. v.9, p.1023-1032, 2002.

MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F. Emulsions in health care applications – An overview. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 23, n. 1-3, p. 419-239, 2002.

MARUNO, M. **Avaliação da hidratação cutânea a partir de emulsões simples e/ou complexadas contendo hidrolisado de proteínas.** Ribeirão Preto, 128 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

MARUNO, M.; **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas com óleo de framboesa para queimaduras de pele.** Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2009.

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

MASSARO, R.C.; ZABAGLIA, M.S.; SOUZA, C.R. F.; OLIVEIRA, W.P.; Del LAMA, D.S.; ROCHA-FILHO, P.A. O/W dispersions development containing liquid crystals. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v. 142, p.264-270,2003.

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

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. 163f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MERCALI, C.A. **Estudo do perfil fitoquímico, nutricional e atividade biológica do broto de girassol (*Helianthus annus L.*).** 107f. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

MORAIS, J.M.; ROCHA-FILHO, P.A.; BURGUESS, D.J.. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. **Langmuir**, 25(14), 7954-7961, 2009.

MORRISON, J. D.; ROSS, S. Emulsions. **Colloidal Dispersions – Suspensions, emulsions and foams**, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 420-455, 2002.

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 387-399, 2001.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, E.C.V. **Desenvolvimento e caracterização de creme para as mãos contendo cristais líquidos para auxílio no tratamento de doenças ocupacionais**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

OLIVEIRA, E.C.V.; BOOCK, K.P.; MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P.A. Accelerated stability and moisturizing capacity of emulsions presenting lamellar gel phase obtained from Brazilian natural raw material. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, p. 1135-1139, 2011.

PARK, B. D.; KIM, Y.; LEE, M.; YOUM, J. K.; JEONG, S.; CHOI, E. H.; LEE, S. H. Properties of a pseudoceramide multi-lamellar emulsions in vitro and in vivo. **Cosmetics & Toiletries**, v. 166, n. 6, p. 65-67, 2001.

PEDERSEN, A.; BAUMSARK, M. W.; MARCKMANN, P.; GYLLING, H.; SANDSTRON, B. An olive oil-rich diet results in higher concentrations of LDL cholesterol and a higher number of LDL subfraction particles than rapeseed oil and sunflower oil diets. **Journal of Lipid Research** 41(12):1901-1911, 2000.

PEREIRA, T.A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A à base de óleo de framboesa (*Rubus idaeus*), maracujá (*Passiflora edulis*) e pêssego (*prunus pérsica*): avaliação das propriedades hidratantes da formulação**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science** , v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

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

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5º ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1996.

PROKSCH, E.; NISSEN, H.P.; BREMGARTNER, M.; URQUHART, C. Bathing in a magnesium-rich dead sea salt solution improves skin barrier function, enhances skin hydration, and reduces inflammation in atopic dry skin. **International Journal of Dermatology**, v. 44, p. 151-157, 2005.

RAHATE, A. R.; NAGARKAR, J. M. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**. V. 28, P. 1077-1080, 2007.

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

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

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

RIBEIRO, A.M.;KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: 12º Congresso Nacional de Cosmetologia, São Paulo, 1996. ANAIS. São Paulo, **Associação Brasileira de Cosmetologia**, p.349-375, 1996.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. 2ª edição, São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 1. Edição, São Paulo: São Paulo: Pharmabooks, 2006.

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

SAJJADI, S. JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M.; BROOKS, B.W. Phase inversion in abnormal o/w/o emulsion: effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance. **Industry and Engineering Chemical Research**, v. 42, p. 3571-3577, 2003.

SALAGER, J. L. Formulation Concepts for the Emulsion Maker. In Nielloud F, Marti-Mestres G, editors. **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**, New York: Marcell & Dekker Inc. p 19-71, 2000.

SANTOS, O. D. H., MIOTO, J.V., MORAIS, J.M., 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.

SANTOS, O.D.H.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; AGUIAR, T.A.; ROCHA FILHO, P.A. Development of vegetable oil emulsion with lamellar liquid-crystalline. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, p. 433-438, 2011.

SANTOS, O. D. H., SACAI, F., FERRARI, M., ROCHA-FILHO, P. A. Liquid Crystals in O/W emulsions with urea: development and testing. **Cosmetics & Toiletries**, New York, v. 119, n. 12, p. 83-92, 2004.

SANTOS, O. D. H.; CAMARGO, M. F. P.; ANDRADE, F. F.; ROCHA FILHO, P. A. Study of liquid-crystalline phase changes during evaporation in vegetable oil emulsions, **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, n. 7. 2006.

SANTOS, O. D. H.; CAMARGO, M. F. P.; BOOCK, K. P.; BERGAMASCHI, M. M.; ROCHA FILHO, P. A. Analysis of the phase changes during evaporation of emulsions with different oil phases. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, p. 394-398, 2009.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J.P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, p. 221-228, 2008.

SCHEIBMEIR, H.D.; WHITAKER, S.H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R.; PIERCE, J. D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 21, p. 24-28, 2005.

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

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, 2006.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de Emulsões. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 8, n.5, p. 37-46, 1996.

SORIANO, M. M.; CONTRERAS, M. J. F.; FLORES, E. S. Development of a cream from a self-emulsifying and moisturizing actives. **Fármaco**, V. 56, p. 513 – 522, 2001.

SOUZA, C. R. F.; GEORGERTTI, S.; SALVADOR, M. J.; FONSECA, M. J. V.; OLIVEIRA, W. P.. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted be dried extracts of Bauhinia forficata. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 46, p. 200-207, 2009.

STEINER, D. Antioxidantes no tratamento do envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 23, p. 30, 2011.

STEINER, D.. Terapia Antioxidante. **Cosmetic & Toiletries** (edição em português), V. 18, n. 2, p. 34, 2006.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the longterm physical stability of emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 227-258, 2004.

TADROS, T.; NESTOR, J.; CLAIRE-TAELMAN, M.; SMITS, R. Emulsões: correlação da estabilidade física de longo prazo com medições reológicas de curto prazo. **Cosmetics and Toiletries** (edição em português), v. 19, p. 60 – 65, 2007.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN, B. G.; MATHE, G. Polyphenols: do they a role the prevention of human pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 200-207, 2002.

THIELE, J. J.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 28, p. 646-667, 2007.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: Rosoff, M. (ed.) **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York, VCH, cap. 4, p. 125-162, 1989.

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

VISOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochemical Biophyscal Research Communications**. V. 247, p. 60-64, 1998.

WASSAN, D. T.; NIKOLOV, A. D. Foams and emulsions: the importance structural forces. **Australian Journal Chemistry**, v. 60, p. 633-637, 2007.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. **Food Chemistry**, v.115, p.758-765, 2009.

WENDT, S. B. T. **Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais.** Ciências Veterinárias, Curitiba: Universidade Federal do Paraná. p 85, 2005.

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

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Reseach International**, v. 33, p. 449-459, 2000.

APÊNDICE A

Diagrama Ternário O1T2

Tabela A: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O1T2

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	5,0	5,0	10,0	22,5	7,5	30,0	60,0
27	10,0	10,0	20,0	15,0	5,0	20,0	60,0
28	5,0	5,0	10,0	15,0	5,0	20,0	70,0
34	15,0	15,0	30,0	7,5	2,5	10,0	60,0
35	10,0	10,0	20,0	7,5	2,5	10,0	70,0
36	5,0	5,0	10,0	7,5	2,5	10,0	80,0

Tabela B: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O1T2

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27		X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		X
35		X	X		X
36			X		X

Diagrama Ternário O1T3

Tabela C: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O1T3

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	2,5	7,5	10,0	22,5	7,5	30,0	60,0
27	5,0	15,0	20,0	15,0	5,0	20,0	60,0
28	2,5	7,5	10,0	15,0	5,0	20,0	70,0
34	7,5	22,5	30,0	7,5	2,5	10,0	60,0
35	5,0	15,0	20,0	7,5	2,5	10,0	70,0
36	2,5	7,5	10,0	7,5	2,5	10,0	80,0

Tabela D: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O1T3

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		
27	X		X		
28	X		X		
34		X	X		
35		X	X		X
36			X		X

Diagrama Ternário O2T1

Tabela E: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O2T1

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos®	Dermabase®	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	7,5	2,5	10,0	15,0	15,0	30,0	60,0
27	15,0	5,0	20,0	10,0	10,0	20,0	60,0
28	7,5	2,5	10,0	10,0	10,0	20,0	70,0
34	22,5	7,5	30,0	5,0	5,0	10,0	60,0
35	15,0	5,0	20,0	5,0	5,0	10,0	70,0
36	7,5	2,5	10,0	5,0	5,0	10,0	80,0

Tabela F: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O2T1

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27		X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		
35		X	X		X
36				X	X

Diagrama Ternário O2T2

Tabela G: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O2T2

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos®	Dermabase®	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	5,0	5,0	10,0	15,0	15,0	30,0	60,0
27	10,0	10,0	20,0	10,0	10,0	20,0	60,0
28	5,0	5,0	10,0	10,0	10,0	20,0	70,0
34	15,0	15,0	30,0	5,0	5,0	10,0	60,0
35	10,0	10,0	20,0	5,0	5,0	10,0	70,0
36	5,0	5,0	10,0	5,0	5,0	10,0	80,0

Tabela H: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O2T2

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27		X	X		X
28				X	X
34		X	X		
35		X	X		X
36				X	X

Diagrama Ternário O2T3

Tabela I: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O2T3

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos®	Dermabase®	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	2,5	7,5	10,0	15,0	15,0	30,0	60,0
27	5,0	15,0	20,0	10,0	10,0	20,0	60,0
28	2,5	7,5	10,0	10,0	10,0	20,0	70,0
34	7,5	22,5	30,0	5,0	5,0	10,0	60,0
35	5,0	15,0	20,0	5,0	5,0	10,0	70,0
36	2,5	7,5	10,0	5,0	5,0	10,0	80,0

Tabela J: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O2T3

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27		X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		
35		X	X		X
36			X		X

Diagrama Ternário O3T1

Tabela K: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O3T1

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos®	Dermabase®	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	7,5	2,5	10,0	7,5	22,5	30,0	60,0
27	15,0	5,0	20,0	5,0	15,0	20,0	60,0
28	7,5	2,5	10,0	5,0	15,0	20,0	70,0
34	22,5	7,5	30,0	2,5	7,5	10,0	60,0
35	15,0	5,0	20,0	2,5	7,5	10,0	70,0
36	7,5	2,5	10,0	2,5	7,5	10,0	80,0

Tabela L: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O3T1

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		
27	X	X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		X
35		X	X		X
36			X		X

Diagrama Ternário O3T2

Tabela M: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O3T2

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	5,0	5,0	10,0	7,5	22,5	30,0	60,0
27	10,0	10,0	20,0	5,0	15,0	20,0	60,0
28	5,0	5,0	10,0	5,0	15,0	20,0	70,0
34	15,0	15,0	30,0	2,5	7,5	10,0	60,0
35	10,0	10,0	20,0	2,5	7,5	10,0	70,0
36	5,0	5,0	10,0	2,5	7,5	10,0	80,0

Tabela N: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O3T2

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		
27	X	X	X		
28	X		X		X
34		X	X		
35		X	X		X
36			X		X

Diagrama Ternário O3T3

Tabela O: Detalhamento das concentrações (%) dos componentes do diagrama ternário O3T3

Pontos	Tensoativos			Óleos			Água
	Crodafos [®]	Dermabase [®]	Total	Girassol	Mineral	Total	Total
21	2,5	7,5	10,0	7,5	22,5	30,0	60,0
27	5,0	15,0	20,0	5,0	15,0	20,0	60,0
28	2,5	7,5	10,0	5,0	15,0	20,0	70,0
34	7,5	22,5	30,0	2,5	7,5	10,0	60,0
35	5,0	15,0	20,0	2,5	7,5	10,0	70,0
36	2,5	7,5	10,0	2,5	7,5	10,0	80,0

Tabela P: Resultados das análises macro e microscópica das formulações obtidas no diagrama O3T3

	Oleosa	Cerosa	Dispersão		Cristais Líquidos
			Polidispersa	Monodispersa	
21	X		X		X
27	X	X	X		X
28	X		X		X
34		X	X		X
35		X	X		X
36			X		X

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício CEP/FCFRP nº. 031/2009
dvp

Ribeirão Preto, 25 de agosto de 2009.

Ilmo. Sr.

PROF. DR. PEDRO ALVES DA ROCHA FILHO

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Assunto: **Aprovação de protocolo de pesquisa.**

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP, em sua 72ª Sessão Ordinária, realizada em 25/08/2009, aprovou o projeto de pesquisa intitulado “DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE EMULSÕES CONTENDO CRISTAIS LÍQUIDOS À BASE DE ÓLEO DE GIRASSOL: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE ÉSTERES”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 155.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP – FCFRP/USP