

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões
contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3

Débora Granemann e Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^o. Dr^o. André Rolim Baby

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões
contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3

Débora Granemann e Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^o. Dr^o. André Rolim Baby

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Silva, Débora Granemann e
S586d Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de
nanoemulsões contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3 /
Débora Granemann e Silva. -- São Paulo, 2013.
78p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Baby, André Rolim

1. Proteção solar : Cosméticos 2. Emulsões cosméticas :
Cosméticos I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.

668.55 CDD

Débora Granemann e Silva

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões
contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profº. Drº. André Rolim Baby
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao estimado orientador, Prof^o. Dr^o. André Rolim Baby titular no Laboratório de Cosmetologia desta universidade, pelo incentivo e auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

A Prof^a. Dr^a. Maria Valéria Robles Velasco, titular no Laboratório de Cosmetologia desta universidade, pelas discussões e sugestões;

A Prof^a. Dr^a. Nádia Araci Bou Chacra, titular no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e de Cosméticos, pela ajuda com o planejamento dos experimentos;

A Prof^a. Dr^a. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas, titular no Laboratório de Biofísicoquímica do Instituto de Química desta universidade, pela assistência e disponibilização do equipamento de espectrometria acústica usado para realizar as medições de tamanhos de partículas e das distribuições de tamanhos;

A todos os professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas, que se dedicam ao ensino de pós-graduação nesta universidade, que colaboram na interdisciplinaridade, possibilitando uma formação acadêmica harmoniosa e profícua na produção de informações que me foram essenciais na elaboração desta dissertação;

Aos funcionários e técnicos da pós-graduação, pela atenção e ajuda com o uso de equipamentos, material de laboratório, regularização de documentos e demais tarefas de rotina;

A todos os queridos colegas da pós-graduação com os quais compartilhei momentos de amizade e aprendizagem;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro;

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho.

RESUMO

SILVA, D.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A nanotecnologia se aplica a diversos setores da ciência, sendo que na área cosmética os investimentos têm reforçado a ideia de que produtos nanotecnológicos proporcionam vantagens reais aos consumidores. A exposição excessiva à luz solar pode causar efeitos indesejáveis como eritemas e câncer de pele, logo, os filtros solares são usados como auxílio na prevenção de tais efeitos. O *p*-metoxicinamato de octila e a benzofenona-3 são filtros UV químicos que absorvem radiação UVB e UVA respectivamente, ambos são amplamente empregados em produtos fotoprotetores. A crescente exigência do consumidor e os avanços no conhecimento sobre a obtenção e estabilidade dos sistemas dispersos viabilizam o desenvolvimento de veículos diferenciados, como as nanoemulsões, que além da inerente estabilidade apresentam aspecto sensorial agradável e alta capacidade de espalhabilidade. Um método eficiente para se obter nanoemulsão, empregando baixa energia de emulsificação é da temperatura de inversão de fases (*Phase Inversion Temperature, PIT*), baseado na mudança de solubilidade dos tensoativos não iônicos etoxilados com a variação da temperatura. Foram objetivos do presente estudo: desenvolvimento de nanoemulsão contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3, empregando o método da *PIT*; determinação do tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos por meio de espectrometria acústica; determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração; e a avaliação da influência das variáveis, velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio no processo de desenvolvimento da nanoemulsão. A nanoemulsão apresentou valor da *PIT* de 72,0 °C, brilho azulado, fluidez e estabilidade por, pelo menos, 90 dias quando armazenada em temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C). A distribuição de tamanhos de partícula apresentou perfil bimodal com médias de tamanhos de 10 nm (61%) e 4,5 µm (39%). A avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* apresentou FPS igual a 8,0 ± 0,9, não alcançando o potencial de “amplo espectro”. A velocidade de agitação, a concentração de glicerina e de cloreto de sódio influenciaram na *PIT*, mas não no tamanho de partícula ou eficácia fotoprotetora *in vitro*. Sendo que, a concentração de NaCl teve maior influência na *PIT*, seguida pela concentração de glicerina e velocidade de agitação.

Palavras-chave: Nanoemulsão, Temperatura de Inversão de Fases, FPS, *p*-Metoxicinamato de octila, Benzofenona-3.

ABSTRACT

SILVA, D.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de eficácia fotoprotetora de nanoemulsões contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Nanotechnology applies to various sectors of science, and in the cosmetics area, investments have enhanced the idea that nanotechnology products provide real benefits to consumers. Excessive exposure to sunlight can cause side effects such as erythema and skin cancer, thus sunscreens are used in preventing such effects. The octyl methoxycinnamate and benzophenone-3 are chemical UV filters which absorb UVB and UVA radiation respectively, both are widely used in sunscreens products. The increasing consumer demand and advances in knowledge about the production and stability of dispersed systems enable the development of differentiated vehicles, such as nanoemulsions, which besides the inherent stability, show pleasant sensorial aspect, and high spread ability. An efficient method for obtaining nanoemulsion, employing low energy of emulsification is the phase inversion temperature (Phase Inversion Temperature, *PIT*) based on the change in solubility of ethoxylated nonionic surfactants with temperature variation. The objectives of this study: development of nanoemulsion containing *p*-octyl methoxycinnamate and benzophenone-3, using the method of *PIT*; determination of particle size and size distribution by means of acoustic spectrometer; determination of *in vitro* photoprotective efficacy by diffuse reflectance spectrophotometer with integrating sphere; and evaluation of the influence of variables, speed of agitation, concentration of glycerin and sodium chloride in the development process of the nanoemulsion. The nanoemulsion showed the *PIT* value of 72.0 °C, bluish brightness, fluidity and stability for at least 90 days if stored at room temperature (22.0 ± 2.0 °C). The particle size distribution showed bimodal profile with average sizes of 10 nm (61%) and 4.5 µm (39%). The evaluation of the *in vitro* photoprotective efficacy showed FPS equal to 8.0 ± 0.9, not reaching the potential of "broad spectrum". The speed of agitation, concentration of glycerin and sodium chloride affected the *PIT* but not in the particle size or *in vitro* photoprotective efficacy. Given that the NaCl concentration had greater influence on the *ITP*, then the glycerin concentration and agitation speed.

Keywords: Nanoemulsion, Fase Inversion Temperature, SPF, octyl methoxycinnamate, benzophenone-3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo/água (O/A) e água/óleo (A/O)21.....	24
Figura 2 -	Equipamentos utilizados para determinação da <i>PIT</i> . (A) Chapa metálica com aquecimento; (B) Agitador mecânico, 400 rpm; (C) Termômetro; (D) Condutivímetro.....	36
Figura 3 -	Relação entre condutividade e temperatura, na determinação da <i>PIT</i> . A queda acentuada da condutividade a partir de 72,0°C evidenciou a inversão da emulsão de O/A para A/O e determinou a <i>PIT</i>	37
Figura 4 -	Emulsão com aspecto translúcido e brilho azulado, obtida através do método da <i>PIT</i>	38
Figura 5 -	Espectrômetro acústico (DT-1200, Dispersion Technology Inc., Bedford Hills, NY) utilizado para determinação do tamanho de partícula e da distribuição de tamanhos da nanoemulsão. Foto: Laboratório de Biofísicoquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.....	40
Figura 6 -	Perfil bimodal de distribuição do tamanho de partículas, com média de tamanhos localizada por volta de 10 nm (61%) e 4,5 µm (39%).....	42
Figura 7 -	Espectrofotômetro equipado com detector tipo esfera de integração (Ultraviolet Transmittance Analyzer, UV2000S, Labsphere, US) usado para avaliação <i>in vitro</i> da proteção solar da nanoemulsão. Foto: Laboratório de Cosmetologia, Universidade de São Paulo.....	43
Figura 8 -	Espectro de absorbância UV da nanoemulsão, demonstrando a absorbância UV na faixa UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) em nove diferentes pontos do substrato.....	44
Figura 9 -	Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são significantes quando correlacionados com a <i>PIT</i>	49
Figura 10 -	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores A, B e C são significantes quando correlacionados com a <i>PIT</i> enquanto que os fatores BC, ABC, AB, AC são insignificantes. O fator B têm maior influência, seguido por C e por A respectivamente.....	50
Figura 11 -	Gráficos de resíduos para a <i>PIT</i> . Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos não indicam violação das suposições estatísticas.....	52

- Figura 12 - Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são insignificantes quando correlacionados com o tamanho de partícula.... 54
- Figura 13 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores A, B, C, AB, AC, ABC e BC são insignificantes quando correlacionados com o tamanho de partícula.. 55
- Figura 14 - Gráficos de resíduos para o tamanho de partícula. Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos mostram que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam..... 56
- Figura 15 - Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são insignificantes quando correlacionados com o FPS..... 58
- Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores C, BC, AB, ABC, B, AC e A são insignificantes quando correlacionados com o fator de proteção solar (FPS)..... 59
- Figura 17 - Gráficos de resíduos para o FPS. Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos mostram que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de fundos públicos aplicados em pesquisas para o desenvolvimento de nanotecnologias.....	17
Tabela 2 - Adaptação da Escala de Granulometria das Emulsões.....	25
Tabela 3 - Composição preliminar quali e quantitativa (% p/p) da formulação nanoestruturada.....	30
Tabela 4 - Planejamento fatorial 3^3 (<i>DOE</i> , <i>Minitab</i> [®]) para otimização do processo de desenvolvimento da nanoemulsão.....	33
Tabela 5 - Composição quali e quantitativa (% p/p) das amostras elaboradas no planejamento experimental do tipo fatorial, 3^3 (<i>DOE</i> , <i>Minitab</i> [®]), para otimização do processo de desenvolvimento da nanoemulsão.....	34
Tabela 6 - Parâmetros medidos na avaliação de proteção solar <i>in vitro</i> da nanoemulsão	45
Tabela 7 - Valores de <i>PIT</i> determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3^3 , o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na <i>PIT</i> da nanoemulsão.....	48
Tabela 8 - Valores de tamanhos de partículas determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3^3 , o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) no tamanho de partícula da nanoemulsão.....	53
Tabela 9 - Valores de <i>FPS</i> determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3^3 , o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> da nanoemulsão.....	57

LISTA DE SIGLAS

A/O	Água em óleo.....	14
BHT	Butil-hidroxitolueno.....	29
Bz-3	Benzofenona-3.....	21
DOE	Design of experiment.....	33
EDTA Na ₂	EDTA dissódico.....	29
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico.....	27
EPI	Emulsion Phase Inversion.....	26
FPS	Fator de Proteção Solar.....	20
MCO	p-Metoxicinamato de octila.....	21
MHz	Mega hertz.....	32
mS	Micro simens.....	31
NaCl	Cloreto de sódio.....	30
INCI	International Nomenclature for Cosmetics Ingredients.....	29
O/A	Óleo em água.....	14
OLETH-3	Álcool oleílico etoxilado 3 etoxilações.....	29
OLETH-20	Álcool oleílico etoxilado 20 etoxilações.....	29
PIT	Phase Inversion Temperature.....	27
PMMA	Polimetilacrilato.....	32
PSD	Particle Size Distribution.....	31
rpm	Rotações por minuto.....	31
TCC	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico.....	29
UV	Radiação ultravioleta.....	20
UVA	Radiação ultravioleta A.....	20
UVB	Radiação ultravioleta B.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
	2.1 Nanotecnologia.....	17
	2.2 Produtos Cosméticos de Base Nanotecnológica.....	18
	2.3 Segurança no Uso de Produtos Cosméticos de Base Nanotecnológica.....	19
	2.4 Fotoproteção.....	20
	2.5 Emulsões.....	23
	2.6 Nanoemulsões.....	24
	2.7 Vantagens das Nanoemulsões para a Aplicação Cosmética.....	25
	2.8 Métodos de Obtenção das Nanoemulsões.....	26
	2.9 Métodos que Utilizam Baixa Energia de Emulsificação.....	26
	2.10 Método de Emulsificação pela Temperatura de Inversão de Fases (<i>PIT</i>).....	27
3	OBJETIVOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
	4.1 Material.....	29
	4.2 Métodos.....	30
	4.2.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	30
	4.2.1.1 Determinação da Temperatura de Inversão de Fases (<i>PIT</i>).....	31
	4.2.1.2 Obtenção da Nanoemulsão.....	31
	4.2.2 Determinação do Tamanho de Partícula.....	31
	4.2.3 Determinação da Eficácia Fotoprotetora <i>in vitro</i>	32
	4.2.4 Influência das Variáveis no Processo de Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	33
	4.2.5 Análise Estatística dos Resultados.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
	5.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	36
	5.1.1 Determinação da Temperatura de Inversão de Fases (<i>PIT</i>).....	36
	5.1.2 Obtenção da Nanoemulsão.....	37
	5.2 Determinação do Tamanho de Partícula.....	39

5.3	Determinação da Eficácia Fotoprotetora <i>in vitro</i>	42
5.4	Influência das Variáveis no Processo de Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	47
5.4.1	Influência das Variáveis na Temperatura de Inversão de Fases (<i>PIT</i>).....	48
5.4.2	Influência das Variáveis no Tamanho de Partícula.....	52
5.4.3	Influência das Variáveis na Eficácia Fotoprotetora <i>in vitro</i>	56
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICES.....	70
	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Nanociência é o estudo de fenômenos e manipulação de materiais na escala atômica, molecular e macromolecular, que apresentam propriedades significativamente diferentes quando comparadas com as de maior escala. A nanotecnologia inclui o desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica (THE ROYAL SOCIETY AND ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Atualmente, considerável parte dos produtos cosméticos disponíveis no mercado mundial é de base nanotecnológica como, por exemplo: partículas metálicas para aumento de brilho em maquiagens, nanoemulsões hidratantes, proteção de ativos contra a degradação, liberação de ativos antirrugas em camadas mais profundas da pele, melhora da textura do creme e formação de película mais eficiente de protetores solares (GUMIERO, 2011).

A exposição moderada ao sol traz benefícios ao ser humano, como sensação de bem estar físico e mental, estímulo à produção de melanina, tratamento de icterícia, etc. Porém, a radiação solar também pode causar prejuízos ao organismo (FLOR *et al.*, 2007). A incidência de câncer de pele têm aumentado continuamente e a principal causa é o excesso de exposição a radiação solar. Desta forma, o uso em larga escala de protetores solares têm sido indicado por diversas instituições internacionais como o método mais apropriado para reduzir os danos causados pela radiação solar, especialmente o câncer de pele e o envelhecimento precoce (ANDREASSI, 2011).

Emulsões são dispersões coloidais de pelo menos dois líquidos imiscíveis, formando um sistema termodinamicamente instável. Conseqüentemente, as emulsões não são formadas espontaneamente e suas propriedades dependem não apenas das condições termodinâmicas (composição, temperatura ou pressão), mas também do método de preparação, assim como da ordem de adição dos componentes. A estrutura das emulsões consiste em partículas da fase dispersa (interna) na fase contínua (externa). Emulsões simples, são classificadas como água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) dependendo de qual fase constitui a fase dispersa.

Geralmente, o tamanho de partícula das emulsões fica na faixa micrométrica (FORGIARINI *et al.*, 2001).

Emulsões fluídas e semissólidas vêm sendo amplamente usadas em medicamentos e cosméticos como veículos para compostos ativos e agentes cosméticos para a pele (ECLESTON, 1997). Nanoemulsões são emulsões com tamanho de partícula muito pequeno. Embora sua definição é encontrada em função do seu tamanho, essa faixa de tamanho não está muito bem definida. De modo geral, é um sistema entre as microemulsões e as emulsões (PEY *et al.*, 2006). São sistemas metaestáveis, geralmente fluídos, com brilho azulado e aspecto que pode variar de translúcido a opaco, dependendo do tamanho das partículas (MASON *et al.*, 2006; PEY *et al.*, 2006).

As propriedades das nanoemulsões permite o desenvolvimento de produtos com aspectos visual e sensorial diferenciados. Estas características são extremamente valorizadas em produtos cosméticos, onde a continuidade de uso pelo consumidor depende da apreciação do produto (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004). Neste sentido, Sonneville-Aubrun e colaboradores (2004) testaram uma nanoemulsão corporal com 192 voluntários. O produto foi aplicado durante duas semanas. Oitenta por cento dos voluntários apreciaram a textura fluída e transparente do produto. Oitenta e oito por cento deles apreciaram o frescor, 72% o poder de hidratação e 84% os resultados cosméticos. Oitenta por cento dos voluntários preferiram a nanoemulsão do que a emulsão usual. Enfim, foi considerado por 96% dos voluntários como um novo veículo para cuidados com a pele.

A razão para o estudo do tema proposto emerge no interesse do desenvolvimento de produtos cosméticos diferenciados com vistas nas possíveis aplicações tópicas ou como fonte de investigação para aprimoramento do processo de obtenção dos mesmos. O amplo emprego das nanoemulsões em indústrias cosméticas e farmacêuticas, assim como a crescente preocupação com os danos causados pelo excesso de exposição a radiação solar são suficientes para sua escolha como tema de estudos farmacotécnicos, seguido de estudos como a comprovação de eficácia. Além disso, justifica-se a elucidação do tamanho de partícula e da influência de variáveis no processo de obtenção da nanoemulsão.

Este estudo visou desenvolver uma nanoemulsão fotoprotetora empregando método de baixa energia, assim como determinar o tamanho de partícula e a eficácia fotoprotetora *in vitro* do sistema obtido, considerando a possível influência de três variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e concentração de cloreto de sódio) no processo de desenvolvimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia pode ser definida como sendo o desenvolvimento de pesquisa e tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular na faixa de dimensões entre 1 e 100 nanômetros para fornecer entendimento fundamental dos fenômenos e materiais na nanoescala. As propriedades e funções diferenciadas são desenvolvidas em escala crítica da dimensão da matéria que se encontra abaixo de 100 nm. A pesquisa e o desenvolvimento em nanotecnologia incluem manipulação, sob condições controladas, das estruturas em nanoescala e sua integração em materiais e sistema de escala superior (NATIONAL SCIENCE FOUNDATION, 2000)

A *National Science Foundation* estima que em 2015, a nanotecnologia alcançará impacto na economia global de cerca de 1 trilhão de dólares e envolverá cerca de 2 milhões de trabalhadores. Essas estimativas têm atraído grande número de investimentos e, como pode ser verificado na Tabela 1, o investimento global em nanotecnologia é considerável e crescente em diferentes partes do mundo (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Tabela 1 – Exemplos de fundos públicos aplicados em pesquisas para o desenvolvimento de nanotecnologias (EUROPEAN COMMISSION, 2004)

Região	Investimentos em Nanotecnologia
Europa	1 bilhão de euros em 2004
Japão	800 milhões de dólares em 2003
Estados Unidos	3,7 bilhões de dólares de 2005 a 2008
Reino Unido	45 milhões de libras por ano de 2003 a 2009

O relatório da *The Royal Society and Academy of Engineering*, publicado em julho de 2004, divide a nanotecnologia em quatro grandes áreas: nanomateriais, nanometrologia, eletrônica, optoeletrônica, informação e tecnologia de comunicações, nanobiotecnologia e nanomedicina (THE ROYAL SOCIETY AND ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

No segmento cosmético a nanobiotecnologia tem encontrado internacionalmente inúmeras aplicações, representando potencial de desenvolvimento tecnológico para o Brasil. Cabe salientar que a expressão do setor de cosméticos no cenário nacional pode ser exemplificada pelo crescimento da ordem de 8,2% nos últimos cinco anos somando entre 2000 e 2004, uma elevação de R\$ 5,6 bilhões no faturamento. Internacionalmente a empresa pioneira a introduzir um cosmético de base nanotecnológica foi a L'Oreal® em 1995 (FRONZA *et al.*, 2007).

Nanocosmético pode ser definido como sendo uma formulação cosmética que veicula ativos ou demais componentes nanoestruturados e que apresenta propriedades superiores quanto a sua performance em comparação com produtos convencionais. Do ponto de vista científico, as vantagens do uso da nanobiotecnologia na produção de nanocosméticos e formulações dermatológicas são concernentes à proteção de compostos quanto à degradação química ou enzimática, ao controle de sua liberação e ao prolongamento do tempo de residência dos ativos cosméticos ou fármacos na camada córnea (FRONZA *et al.*, 2007).

2.2 Produtos Cosméticos de Base Nanotecnológica

A realização de uma estimativa que dimensiona produtos nanocosméticos inseridos no mercado é complexa. Neste sentido, foi realizada uma busca de produtos de base nanotecnológica disponíveis no mercado nacional através da internet, utilizando-se do *website* das empresas da área. A lista das empresas da área de cosméticos utilizadas para a busca foi aquela divulgada no banco de dados do Anuário Brasileiro de Informação Cosmética (ABI COSMÉTICA, 2010; FRONZA *et al.*, 2007).

Os produtos identificados pertencem a diversas categorias, incluindo, produtos destinados à aplicação na pele do rosto e corpo. Existe tendência a um maior número de produtos de aplicação no rosto, e especialmente, na região dos olhos. Vários fazem menção à ação anti-rugas, fotoprotetora e firmadora da pele, indicando aplicação destes produtos em formulações anti-envelhecimento cutâneo (ABI COSMÉTICA, 2010; FRONZA *et al.*, 2007).

Em relação ao tipo de nanoestrutura, as descrições dos produtos empregam com frequência denominações comerciais que não permitem a identificação direta do tipo de nanoestrutura, como por exemplo, fitossomas, glicosferas, aquasferas, nanotecnologia e *ultraspheres*[®]. Essas denominações, que não seguem classificação usual ou acadêmica, como lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas, são frequentes nos produtos nanocosméticos (ABI COSMÉTICA, 2010; FRONZA *et al.*, 2007).

2.3 Segurança no Uso de Produtos Cosméticos de Base Nanotecnológica

A crescente demanda por produtos cosméticos de base nanotecnológica têm despertado discussões sobre aspectos relacionados à segurança no uso destes produtos, devido ao tamanho extremamente reduzido das partículas. Diversas organizações têm demonstrado preocupação neste sentido (4TH NANOFORUM, 2005). Os nanomateriais apresentam propriedades diferenciadas que vêm sendo destacadas de forma positiva, tais como aumento na superfície de contato e habilidade para atravessar membranas, mas que eventualmente podem resultar em aumento da toxicidade (THE ROYAL SOCIETY AND ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Além disso, existe a necessidade de adequar os atuais ensaios para avaliação de segurança e outras características relevantes de produtos cosméticos de base nanotecnológica. Atualmente, o primeiro passo na avaliação de segurança de um produto cosmético é conduzir um teste de toxicidade baseado no perfil toxicológico das matérias-primas e na rota de exposição. Resultados obtidos destes testes podem indicar a necessidade de testes adicionais (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os produtos cosméticos devem ser formulados com matérias-primas referenciadas (compêndios e legislação), deixando uma margem de segurança entre o nível de risco e o nível de uso do produto, informando o consumidor, da maneira mais clara possível, a fim de evitar mau uso do produto e seguindo as boas práticas de fabricação e controle (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

2.4 Fotoproteção

A exposição excessiva a radiação ultravioleta (UV) é responsável por ampla variedade de efeitos na pele. Alguns positivos, como síntese de vitamina D, mas também alguns negativos como eritema, fotoenvelhecimento e câncer de pele. Um aumento na conscientização pública a respeito dos efeitos causados pela radiação UV na pele vêm resultando em aumento no interesse por produtos denominados protetores solares (NIKOLIC *et al.*, 2011).

A Academia Americana de Dermatologia recomenda o uso regular de protetor solar para prevenir o câncer de pele. Selecionar um protetor solar adequado é fundamental sendo recomendado o uso diário de um produto com FPS 30. Protetores solares devem ser aplicados generosamente e uniformemente de 15 a 30 minutos antes da exposição ao sol. Para se manterem efetivos, eles devem ser reaplicados com frequência, especialmente quando praticando atividade física ao ar livre. Entretanto, protetores solares representam apenas um único aspecto em fotoproteção. Adotar um comportamento preventivo é a melhor forma de proteção contra os danos induzidos pela radiação UV, tais como evitar o sol entre as 10 e as 16 horas, quando a radiação UV é mais intensa. Procurar ficar na sombra pode ajudar, mas é estimado que 50% da exposição UVA ocorra à sombra (SCHAEFER *et al.*, 1998). Óculos de sol, chapéus de abas largas e roupas adequadas são formas alternativas de proteger a pele contra os efeitos dos raios UV (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Um protetor solar ideal contém múltiplos componentes que refletem e dispersam a radiação UV, absorvem comprimentos de onda, contém mecanismos estabilizadores e interceptam os radicais livres limitando o dano fotoquímico. Atualmente, há tendência no desenvolvimento de protetores solares de amplo espectro, reduzida concentração de filtros UV químicos, proteção elevada frente às radiações UV e com fotoestabilidade adequada (MAIER; KORTING, 2005; MORABITO *et al.*, 2011). A maioria dos filtros protegem numa faixa de radiação UV particular e oferecem fotoproteção insuficiente quando utilizados sozinhos. Produtos de amplo espectro (UVB/UVA) são obtidos pela combinação de filtros com diferentes faixas de absorção UV (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Existem duas categorias clássicas de filtros UV: orgânicos e inorgânicos, classificados, respectivamente, como filtros UV químicos e físicos. Os filtros UV químicos são moléculas orgânicas capazes de absorver radiação UV e a transformar em radiações energéticas menos lesivas ao ser humano (SHAATH, 1997). Filtros UV físicos atuam como fotoprotetores refletindo a radiação UV (MORABITO *et al.*, 2011).

O *p*-metoxicinamato de octila (MCO) é um filtro UV químico, absorve na faixa do UVB e apresenta absorção máxima em 310 nm. Frequentemente é misturado a outros filtros UVB para aumentar o FPS (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Foi desenvolvido na década de 50 e atualmente é empregado na maioria das formulações de protetores solares. Uma vantagem dos cinamatos é que não mancham e raramente causam irritação (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; PALM; O'DONOGHUE, 2007). De acordo Summers e colaboradores (2005), dentre os 105 protetores solares analisados, 88,2% continham MCO. Além disso, foram relatados poucos casos de reações de fotoalergias e fotosensibilizações induzidos por esta molécula (PATTANAARGSON *et al.*, 2004). No entanto, por reduzirem a resistência a água, os protetores solares a base de cinamatos devem ser reaplicados com mais frequência. Embora técnicas de encapsulamento tenham melhorado sua fotoestabilidade, eles degradam ao serem expostos à luz solar, o que diminui sua eficácia (SAMBANDAN; RATNER, 2011). De acordo com a legislação brasileira, a concentração máxima permitida deste composto em preparações cosméticas é equivalente a 10% (BRASIL, 2006). O MCO é um líquido oleoso, transparente, levemente amarelado, inodoro, insolúvel em água, solúvel em etanol e óleo mineral. Seu peso molecular é 290,4 g/mol e o ponto de ebulição está na faixa de 185-195°C (MERCK, 2001).

A benzofenona-3 é o filtro UV químico mais amplamente empregado em formulações de protetores solares em todo o mundo, uma vez que atua absorvendo ambas as radiações UVA e UVB presentes na luz solar. (VIDAL *et al.*, 2007). As benzofenonas em geral são fotoquimicamente estáveis frente às radiações UVA e UVB (MAIER; KORTING, 2005). Devido ao aumento na fotoestabilidade das benzofenonas, octocrileno é frequentemente adicionado a este agente para aumentar o tempo de eficácia. Embora estudos indicam a benzofenona-3 entre os filtros UV que apresentam maior incidência de dermatite de contato alérgica (PALM; O'DONOGHUE, 2007), este não é um efeito comum dos protetores solares

(DARVAY *et al.*, 2001). Caracterizada por massa molar relativamente baixa (228,5 g/mol), com ponto de fusão de 63°C (VIDAL *et al.*, 2007). De acordo com a legislação brasileira, a concentração máxima permitida deste composto em formulações cosméticas é equivalente a 10%, sendo que para concentrações acima de 0,5% se torna necessária a inclusão de advertência na rotulagem “contém oxibenzona”, nome pelo qual a benzofenona-3 também é conhecida (BRASIL, 2006).

A fotoestabilidade dos filtros UV utilizados nos protetores solares, deve se manter constante ao longo do tempo para garantir a eficácia destes produtos. Neste sentido, foi realizado um estudo de fotoestabilidade (COUTEAU *et al.*, 2007) com 18 formulações cosméticas contendo diversos filtros UV, entre eles o *p*-metoxicinamato de octila e a benzofenona-3. Foi observado que o *p*-metoxicinamato de octila apresenta fotoestabilidade “boa” sendo que este sofre mecanismo de isomerização *cis-trans* o que pode ser considerado um modo muito eficiente de dispersar a energia absorvida. A benzofenona-3 apresentou fotoestabilidade “muito boa” (COUTEAU *et al.*, 2007).

Embora os produtos de proteção solar podem efetivamente proteger contra fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, eles podem apresentar efeitos adversos, incluindo sensibilidade de contato, risco de deficiência de vitamina D e estrogénicidade (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Existem relatórios contraditórios referentes a penetração e efeitos sistêmicos de agentes inorgânicos microfinos. Uma revisão do governo australiano concluiu que óxido de zinco e o dióxido de titânio em nano dimensões permanecem na superfície da pele sem penetrar o estrato córneo. Estudos também têm demonstrado que nano partículas de dióxido de titânio pode passar por membranas celulares e prejudicar a função do fibroblasto dérmico humano em culturas (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Alguns filtros UV químicos, incluindo benzofenona-3, têm sido detectados no plasma e na urina após 4 dias de aplicação tópica no corpo inteiro (JANJUA *et al.*, 2008). Sendo importante ressaltar que para obter este resultado, a concentração testada foi a máxima

permitida na Europa e no Brasil, 10% (BRASIL, 2006; JANJUA *et al.*, 2008). Apesar dessas preocupações, os benefícios proporcionados pelo uso apropriado de protetores solares provavelmente superam os riscos de toxicidade. Para determinar definitivamente o risco de absorção sistêmica de filtros UV usados em protetores solares, ajudaria bastante testar as concentrações apropriadas de filtros UV e as formulações fotoprotetoras comerciais, especialmente para crianças e mulheres grávidas (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Uma abordagem para melhorar os protetores solares é desenvolver filtros UV inovadores que sejam adequados e seguros para uso humano (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Em resumo, a eficácia dos protetores solares na redução do envelhecimento cutâneo e do câncer de pele está amplamente documentado na literatura. Embora exista muitas preocupações sobre a segurança dos filtros UV a longo prazo, os benefícios dos protetores solares claramente superam os riscos potenciais. Entretanto, a principal barreira para alcançar estes benefícios é a adesão do consumidor. Usufruir do aprimoramento das tecnologias e da eficácia dos produtos pode exigir reeducação do consumidor e medidas de saúde pública para incentivar o uso de protetor solar (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Novas tecnologias que melhorem a estética e o sensorial do produto podem ajudar a aumentar a continuidade do uso, diminuindo assim a incidência de câncer de pele e do fotoenvelhecimento (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

2.5 Emulsões

Emulsões são definidas como sistemas heterogêneos no qual ao menos um líquido imiscível está disperso em outro na forma de gotículas. Estes sistemas estruturados por associações de tensoativos são amplamente utilizados como produtos cosméticos e dermatológicos como veículos para fármacos e compostos de uso cosmético (ECCLESTON, 1997).

A estrutura das emulsões consiste em gotículas da fase dispersa (interna) envolta pela fase

contínua (ou externa). As emulsões simples podem ser classificadas em água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas em uma fase contínua oleosa, ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas em fase contínua aquosa, conforme representado na Figura 1 (FORGIANINI *et al.*, 2001; BECHER, 1983).

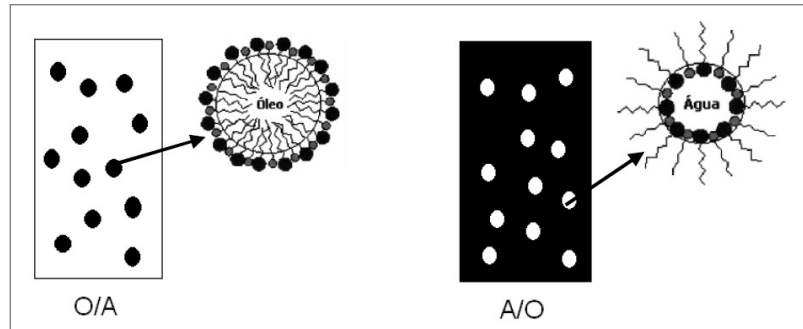


Figura 1 – Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo/água (O/A) e água/óleo (A/O) (OLIVEIRA, 2008)






São compostas por três fases: fase aquosa, fase oleosa e tensoativos, também chamados de surfactantes (MORAIS *et al.*, 2006).

2.6 Nanoemulsões

Nanoemulsões, também conhecidas como miniemulsões, consistem em emulsões muito finas (Tabela 2) com glóbulos de diâmetro na faixa de 50 a 500 nm (FERNANDEZ *et al.*, 2004) ou na faixa de 50 a 200 nm (TADROS *et al.*, 2004). Segundo CAPEK (2004), as nanoemulsões apresentam aspecto translúcido quando o tamanho do glóbulo está na faixa de 50 a 200 nm e aparência leitosa quando este se encontra acima de 500 nm. Ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões exigem quantidades não excessivas de tensoativos, na faixa de 5 a 10%. O tamanho reduzido das partículas permite a deposição uniforme nos substratos. São sistemas metaestáveis, podendo se manter estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não iônicos e/ou polímeros na preparação. Isso acontece devido ao pequeno tamanho de glóbulo, que proporciona redução na força de gravidade superada pelo movimento browniano (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

A granulometria do sistema também previne o fenômeno da coalescência, pois esses glóbulos não são facilmente deformáveis. A espessura do filme interfacial (relativo ao tamanho do glóbulo) previne que a diminuição natural do mesmo não seja significativa, o que levaria ao rompimento do glóbulo (TADROS, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Adaptação da Escala de Granulometria das Emulsões (ANSEL *et al.*, 2000; PEREIRA, 2008)

	Aparência	Denominação	Aspecto
2 - 20 μ m		Macro emulsão	Branca leitosa
0,1 – 0,3 μ m		Nanoemulsão	Branca azulada
< 0,1 μ m		Microemulsão	Translúcida
0,01 μ m		Soluções micelares	Transparentes
0,001 μ m		Soluções moleculares	Transparentes

2.7 Vantagens das Nanoemulsões para a Aplicação Cosmética

Além da estabilidade superior das nanoemulsões, existem outras características pelas quais a sua aplicação na ciência cosmética é vantajosa:

- A permeação das partículas através das rugosidades da pele, inclusive através de peles extremamente ásperas possibilita maior capacidade de hidratação (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004);
- O diminuto tamanho das partículas garante distribuição uniforme do produto sobre a pele (BOUCHEMAL *et al.*, 2004);
- Quanto ao aspecto sensorial, a fluidez natural do sistema (em baixas concentrações da fase oleosa) confere às nanoemulsões características muito valorizadas em produtos cosméticos (TADROS *et al.*, 2004);

- As nanoemulsões podem ser alternativas a lipossomas e vesículas, as quais possuem baixa estabilidade (TADROS *et al.*, 2004);
- Podem ser utilizadas como sistemas de veiculação de fragrâncias, com liberação controlada e na fabricação de perfumes sem álcool (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

2.8 Métodos de Obtenção das Nanoemulsões

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessária a doação de energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta energia de emulsificação ou por métodos que utilizam baixa energia (PEY *et al.*, 2006). Dentre os métodos que utilizam alta energia de emulsificação estão os que utilizam homogenizadores de alta pressão com microfluizadores e os que utilizam ultrassom. Contudo, alguns autores têm relatado algumas desvantagens em relação à utilização de ultrassom, como o aquecimento excessivo da amostra, contaminação do produto com resíduo de titânio provenientes da sonda, larga distribuição de gotículas e baixa reprodutibilidade em relação ao diâmetro da gotícula, além de problemas relacionados às dificuldades de transição da escala (TADROS *et al.*, 2004; PEY *et al.*, 2006; PEREIRA, 2008).

2.9 Métodos que Utilizam Baixa Energia de Emulsificação

Os métodos de emulsificação por baixa energia fazem uso de propriedades físico-químicas do sistema e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido (SHINODA; SAITO, 1968; SAJJADI, 2006; ÚSON *et al.*, 2004). Existem dois métodos de inversão de fases: transicional, conhecida também como método da temperatura de inversão de fases (*Phase Inversion Temperature, PIT*) e emulsificação por inversão de fases pela fração volumétrica (*Emulsion Phase Inversion, EPI*) (MORAIS *et al.*, 2006).

2.10 Método de Emulsificação pela Temperatura de Inversão de Fases (*PIT*)

Para tensoativos não iônicos etoxilados, a inversão transicional pode ser conseguida pela mudança na temperatura do sistema forçando uma transição da emulsão A/O em alta temperatura para uma emulsão O/A em baixas temperaturas (MORAIS *et al.*, 2006).

Os grupos de óxido de etileno, presentes nos tensoativos etoxilados apresentam a capacidade de fazerem ligações de hidrogênio com as moléculas de água, sendo esta capacidade a responsável pela característica hidrofílica típica dos tensoativos não iônicos etoxilados. Conforme a temperatura aumenta, as moléculas exibem maior vibração, inibindo a formação das ligações de hidrogênio. Consequentemente, as etoxilações perdem afinidade pela água e os tensoativos etoxilados se tornam menos solúveis em água (SHINODA; SAITO, 1968; IZQUIERDO *et al.*, 2002; ZENITECH, 2010).

Tensoativos que à temperatura ambiente tem valor de EHL igual a 12,0 (hidrofílico) passam a se comportar como tendo valor de EHL igual a 5,0 (lipofílico), tendendo a formar emulsão A/O. Conforme a temperatura abaixa, as ligações de hidrogênio e o EHL voltam a aumentar. A temperatura em que a emulsão inverte de A/O para O/A é chamada de *PIT*. Quando isto acontece, o tensoativo passa por um ponto de curvatura zero e promove a mínima tensão superficial, o que predispõe a diminuição do tamanho das partículas e consequentemente a formação de nanoemulsões. Ambas propriedades beneficiam a formação de emulsão e se a *PIT* for ao menos 20°C acima da temperatura de armazenagem, há chances de que a emulsão formada apresente estabilidade (SHINODA; SAITO, 1968; IZQUIERDO *et al.*, 2002; ZENITECH, 2010).

3 OBJETIVOS

- Desenvolver nanoemulsão contendo *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3, empregando o método da temperatura de inversão de fases (*PIT*).
- Determinar o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos da nanoemulsão obtida, por meio de espectrometria acústica.
- Determinar a eficácia fotoprotetora *in vitro* da nanoemulsão obtida, por meio de espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.
- Avaliar a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e concentração de cloreto de sódio) sobre a nanoemulsão obtida, por meio de planejamento experimental do tipo fatorial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Todas as matérias-primas utilizadas foram de grau farmacêutico, provenientes de fontes comerciais sem purificação adicional. São citadas a seguir e ordenadas por nomenclatura comercial, seguida da nomenclatura internacional para ingredientes cosméticos (INCI) e respectivo fornecedor.

- Água destilada; *Acqua*
- Álcool cetosteárico; *Cetearyl alcohol*; Mapric[®]
- Álcool oleílico etoxilado 3 EO (Brij[®]O3); *Oleth-3*; Croda[®]
- Álcool oleílico etoxilado 20 EO (Brij[®]O20); *Oleth-20*; Croda[®]
- Benzofenona-3; *Benzophenone-3*; Mapric[®]
- Butil-hidroxitolueno; *BHT*; Mapric[®]
- Cloreto de sódio; *Sodium chloride*; Mapric[®]
- EDTA dissódico; *Disodium EDTA*; Mapric[®]
- Glicerina; *Glycerin*; Mapric[®]
- *p*-Metoxicinamato de octila; *Octyl methoxycinnamate*; Mapric[®]
- Solução de parabenos (metil, etil, propil, butil e isobutil) em fenoxietanol (Phenova[®]); *Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) butylparaben (and) isobutylparaben*; Croda[®]
- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico; *Caprylic/capric triglyceride*; Croda[®]

Todos os equipamentos utilizados são citados a seguir e ordenados por nome funcional, marca e respectivo modelo.

- Agitador mecânico, Fisatom[®], 713D
- Balança analítica, Shimadzu[®], AUY220

- Balança semianalítica, Marte[®], AS2000C
- Chapa de aquecimento, Quimis[®], Q310-223
- Condutivímetro, Digimed[®], DM31
- Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração, Labsphere[®], UV 2000S
- Espectrômetro acústico, Dispersion Technology[®], DT-1200
- Haste com hélice centrífuga, Fisatom[®], 200.350
- Placas de Poli(Metilacrilato) (PMMA), HelioScreen[®], HelioScreen HD6 Plates
- Termômetro, Incoterm[®], -10 +110 °C

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão

Para o desenvolvimento da nanoemulsão foram usados os compostos ativos *p*-metoxicinamato de octila, benzofenona-3 e componentes usualmente empregados em formulações cosméticas. A composição preliminar quali e quantitativa (% p/p) apresenta-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição preliminar quali e quantitativa (% p/p) da formulação nanoestruturada

Composição	% (p/p)	Função
BHT	0,1	Antioxidante
EDTA Na ₂	0,1	Agente quelante
Phenova [®]	0,5	Conservante
NaCl	1,0	Agente de força iônica
Glicerina	5,0	Umectante
Álcool Cetoestearílico	3,0	Agente de viscosidade
Água destilada	q.s.p.	Veículo
<i>p</i> -Metoxicinamato de octila	7,5	Filtro de UV
Benzofenona-3	2,0	Filtro de UV
Triglicérides ácido cáprico/caprílico	5,0	Emoliente
Álcool oleílico 3 EO	2,0	Co-tensoativo
Álcool oleílico 20 EO	10,0	Tensoativo

Legenda – Phenova[®]: Solução de parabenos [metil (and) etil (and) propil (and) butil (and) isobutil] em fenoxietanol

4.2.1.1 Determinação da Temperatura de Inversão de Fases (*PIT*)

A temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), também definida com temperatura de inversão de fases (*PIT*) foi determinada pelo método da condutividade elétrica. Dessa forma, todos os componentes (Tabela 3) foram pesados em béquer de vidro e gradualmente aquecidos sob agitação mecânica (400 rpm) enquanto a condutividade (mS) foi medida em função da temperatura. As leituras de condutividade (mS) foram registradas a partir da temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e a cada incremento de $5,0^{\circ}\text{C}$, até atingir $80,0^{\circ}\text{C}$. A *PIT* foi determinada quando ocorreu diminuição acentuada no valor da condutividade (mS), o que evidenciou a inversão da emulsão de óleo em água (O/A) para água em óleo (A/O) (TADROS *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005; LIN EE *et al.*, 2008).

4.2.1.2 Obtenção da Nanoemulsão

A nanoemulsão foi obtida pelo método da temperatura de inversão de fases (*PIT*). Primeiramente, foi necessário determinar a *PIT*, usando o método da condutividade elétrica descrito no item 4.2.1.1. Então, para preparar a nanoemulsão, todos os componentes da formulação (Tabela 3) foram pesados em béquer de vidro e gradualmente aquecidos sob agitação mecânica (400 rpm) até atingir a temperatura de $5,0^{\circ}\text{C}$ acima da *PIT* previamente determinada. Em seguida, o sistema foi removido da fonte de aquecimento e resfriado em banho de água até a temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$). A agitação mecânica (400 rpm) foi mantida durante todo o processo de aquecimento e de resfriamento. Finalmente, a nanoemulsão obtida foi mantida em repouso por 24 horas (IZQUIERDO *et al.*, 2005; LIN EE *et al.*, 2008).

4.2.2 Determinação do Tamanho de Partícula

O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos (*PSD*) foram medidas por espectrômetro acústico (DT-1200, Dispersion Technology Inc., Bedford Hills, NY). O princípio operacional de um espectrômetro acústico é baseado na geração de pulsos de som que passam através de

uma amostra e são medidos por um receptor. Durante a passagem através da amostra, o som é atenuado pela presença de meio líquido e de quaisquer partículas em dispersão, no receptor as alterações na intensidade energética são medidas. Este espectro de atenuação de frequências resultantes são dados brutos. Estes dados são tratados com um modelo programado para selecionar a melhor distribuição de tamanhos, que gera o espectro de atenuação teórico que se encaixa nos dados experimentais com menor erro. A verificação experimental deste método, com ampla variedade de materiais está discutida na literatura (SUN *et al.*, 2006; DUKHIN *et al.*, 2001; DUKHIN; GOETZ, 2002; BONACUCINA *et al.*, 2009).

Para determinação do tamanho de partícula e da sua distribuição, amostra de nanoemulsão foi preparada, mantida em repouso durante 24 horas e então transferida para o compartimento específico do equipamento sem diluição. As análises foram realizadas em triplicata, no intervalo de distâncias de 0,325-20 mm entre transmissor e receptor e na faixa de frequências de 3-100 MHz. A atenuação do som foi monitorada durante o tempo.

4.2.3 Determinação da Eficácia Fotoprotetora *in vitro*

A eficácia fotoprotetora *in vitro* foi medida por espectrofotômetro equipado com detector tipo esfera de integração (Ultraviolet Transmittance Analyzer, UV-2000S, Labsphere, US). Como substrato, placas de Poli(Metilacrilato) (PMMA) (HD Helioplate[®], HelioScreen, US) foram usadas. Uma amostra da emulsão foi preparada, armazenada por 24 horas e então alíquotas de 0,75 mg/cm² de emulsão foram aplicadas uniformemente no lado rugoso da placa de PMMA. O filme formado sobre a placa foi deixado para secar sob condições ambientais (22,0 ± 2,0°C) por 30 minutos. A absorbância UV do filme foi medida em nove pontos diferentes do substrato. A absorbância resultante foi usada para determinar o fator de proteção solar (FPS) *in vitro*, o comprimento de onda crítico (λ_c) e a razão UVA/UVB. Estes parâmetros foram automaticamente calculados pelo programa do equipamento, UV2000 (COMITÉ DE LIAISON DES INDUSTRIES DE LA PARFUMERIE, 2007; COUTEAU *et al.*, 2007; FERRERO *et al.*, 2006; FERRERO *et al.*, 2010; PISSAVINI *et al.*, 2003; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2008).

4.2.4 Influência das Variáveis no Processo de Desenvolvimento da Nanoemulsão

Em uma nanoemulsão, o tamanho das partículas é fortemente dependente dos métodos de preparação (LIN EE *et al.*, 2008). Para constatar efeitos entre as variáveis da nanoemulsão, foi elaborado um planejamento experimental do tipo fatorial (*DOE*, 3^3 , *Minitab*[®]) selecionando três variáveis em três diferentes níveis, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Planejamento fatorial 3^3 (*DOE*, *Minitab*[®]) para constatar os efeitos entre as variáveis do processo de desenvolvimento da nanoemulsão

Variável	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Velocidade de agitação (rpm)	400	600	800
NaCl (% p/p)	1	2	3
Glicerina (% p/p)	5	10	15

Dessa forma, a composição da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3) foi adaptada com as variações definidas no planejamento fatorial (Tabela 4) resultando em 27 diferentes amostras (Tabela 5).

Tabela 5 – Composição quali e quantitativa (% p/p) das amostras elaboradas no planejamento experimental do tipo fatorial, 3³ (DOE, Minitab®)

Amostra	Composição			
	Componentes Fixos (% p/p)	Componentes Variáveis		
		Agitação (rpm)	Glicerina (% p/p)	NaCl (% p/p)
01	BHT (0,1) EDTA Na ₂ (0,1) Phenova® (0,5) Álcool Cetoestearílico (3,0) Água destilada (q.s.p.) <i>p</i> -Metoxicinamato de octila (7,5) Benzofenona-3 (2,0) Triglicérides ácido cáprico/caprílico (5,0) Álcool oleílico 3 EO (2,0) Álcool oleílico 20 EO (10,0)	800	15	2
02		800	10	3
03		400	10	2
04		400	5	2
05		800	15	1
06		800	5	3
07		600	5	3
08		400	15	2
09		400	5	1
10		600	10	1
11		400	15	3
12		600	5	2
13		800	10	2
14		400	10	3
15		600	15	3
16		800	10	1
17		600	15	1
18		600	5	1
19		400	5	3
20		400	15	1
21		800	5	2
22		600	15	2
23		800	15	3
24		800	5	1
25		400	10	1
26		600	10	2
27		600	10	3

Legenda – Componentes Fixos: componentes cujas proporções permanecem inalteradas; Componentes Variáveis: componentes cujas proporções se alteram em cada amostra, de acordo com o planejamento experimental

As respostas foram em função da *PIT*, do tamanho de partícula e do FPS *in vitro*. Para cada amostra, primeiramente foi determinado a *PIT* conforme metodologia descrita no item 4.2.1.1. Após o preparo, as amostras foram armazenadas durante 24 horas em temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). Em seguida, foi determinado o tamanho de partícula conforme metodologia descrita no item 4.2.2 e, finalmente, foi determinado a eficácia fotoprotetora *in vitro* conforme metodologia descrita no item 4.2.3.

4.2.5 Análise Estatística

Foi realizado planejamento experimental do tipo fatorial, 3^3 (*DOE*, *Minitab*®), para constatar efeitos entre as variáveis da nanoemulsão. Os resultados foram analisados por programa específico (*Minitab*®, versão 15) e foi utilizado o índice de 0,05 como ponto de aceitação de significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão

5.1.1 Determinação da Temperatura de Inversão de Fases (*PIT*)

A temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), também conhecida com temperatura de inversão de fases (*PIT*) da formulação previamente descrita na Tabela 3 foi determinada pelo método da condutividade elétrica descrito no item 4.2.1.1 com auxílio dos equipamentos ilustrados na Figura 2.

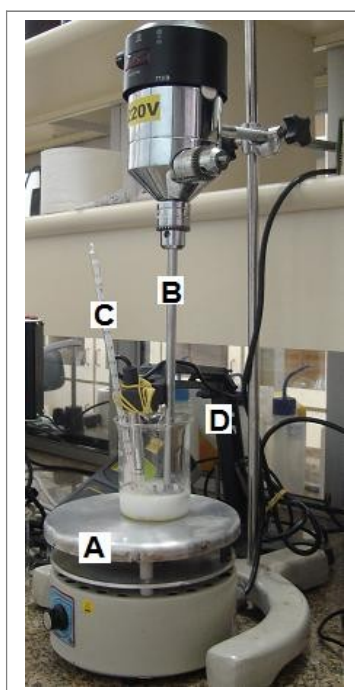


Figura 2 – Equipamentos utilizados para determinação da *PIT*. (A) Chapa metálica com aquecimento; (B) Agitador mecânico, 400 rpm; (C) Termômetro; (D) Condutivímetro. Foto: Laboratório de Cosmetologia, Universidade de São Paulo

Durante o processo de aquecimento da formulação, a condutividade (mS) variou em função da temperatura (°C), conforme demonstrado na Figura 3. A queda acentuada da condutividade a partir de 72,0°C evidenciou a inversão da emulsão de óleo em água (O/A) para água em

óleo (A/O) e determinou a *PIT* (TADROS *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005).

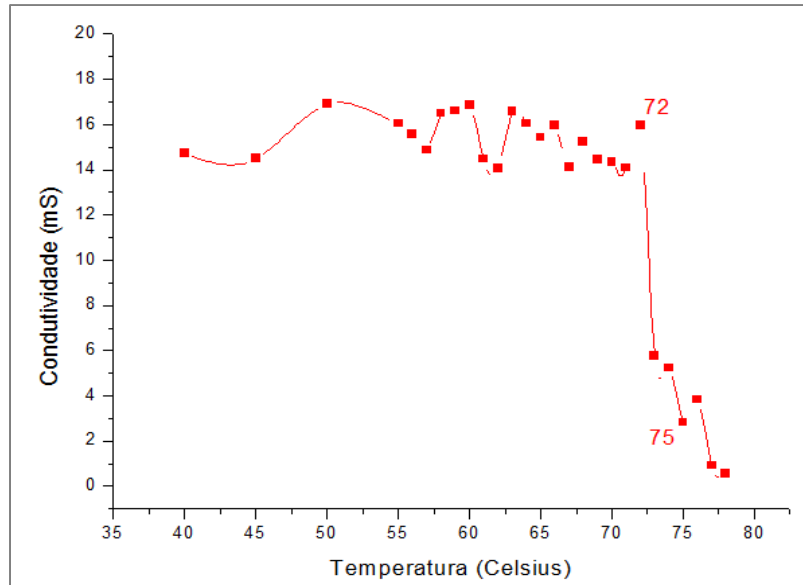


Figura 3 – Relação entre condutividade e temperatura, na determinação da *PIT*. A queda acentuada da condutividade a partir de 72,0°C evidenciou a inversão da emulsão de O/A para A/O e determinou a *PIT*

5.1.2 Obtenção da Nanoemulsão

Por meio da técnica da *PIT* e com base na formulação descrita na Tabela 3, foi obtida emulsão com aspecto translúcido e brilho azulado (Figura 4). De acordo com Mason e colaboradores (2006), nanoemulsões apresentam aspecto visivelmente diferenciado, uma vez que suas partículas podem ser muito menores do que o comprimento de onda óptico do espectro visível. Quanto menor o raio da partícula, maior a faixa de comprimentos de ondas visíveis sobre a qual a transparência é encontrada, especialmente na direção dos comprimentos de onda azul e ultravioletas. No entanto, conforme o raio da partícula se aproxima de 100 nm as nanoemulsões aparentam aspecto nebuloso, e acima desta, na faixa submicron, aparentam aspecto de cor branca devido ao espalhamento múltiplo significativo. Transparência óptica é um bom indicador qualitativo de polidispersão, uma vez que qualquer extensão da distribuição de tamanhos em direção à tamanhos de partículas na microescala fará a nanoemulsão aparentar nebulosa, ainda que a vasta maioria das partículas estejam em nanoescala (MASON *et al.*, 2006).



Figura 4 – Emulsão com aspecto translúcido e brilho azulado, obtida através do método da *PIT*. Foto: Laboratório de Cosmetologia, Universidade de São Paulo

Além disso, a emulsão obtida apresentou consistência aparentemente “leve”. Esta característica particular proporcionou à emulsão toque diferenciado, frequentemente apreciado em produtos cosméticos. De acordo com Tadros (2004), em aplicações de cuidado pessoal, emulsões precisam de certa consistência que possa prover bom espalhamento e sensação agradável sobre a pele. Por esta razão, a consistência de uma emulsão é um parâmetro importante e geralmente avaliada em painéis de aceitabilidade (TADROS, 2004).

A emulsão obtida apresentou aspecto homogêneo e estabilidade quando armazenada em temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) por mais de 90 dias, sob acompanhamento informal (experimento não descrito neste estudo). Emulsões são sistemas termodinâmicos instáveis, sendo sua estabilidade meramente cinética, como descrito por Capek (2004). Como são sistemas metaestáveis, as emulsões podem se manter estáveis por longo período de tempo se não forem perturbadas. Suas estruturas dependem do processo de preparação e estabilização estérica, especialmente quando são usados surfactantes não-iônicos e/ou polímeros. O pequeno tamanho de partícula das nanoemulsões, se comparado às macroemulsões, proporciona-lhes maior estabilidade cinética, evitando cremação e coalescência. No primeiro caso, o movimento browniano supera a taxa de cremação induzida pelas forças gravitacionais. No segundo caso, a espessura do filme na interface da partícula (comparada

com o tamanho da partícula) evita a diminuição da mesma, o que levaria a ruptura e coalescência das partículas (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; TADROS, 2004).

Em aplicações cosméticas, uma série de demandas são importantes quando se está formulando um produto. Primeiramente, é necessário que a formulação original tenha aparência agradável e que mantenha esta aparência durante o tempo de armazenagem. Isto significa que deva se manter estável por longo período de tempo e variações de temperatura. Também são esperados que os produtos cosméticos proporcionem sensação de bem estar e os efeitos benéficos sobre as propriedades da pele e anexos (CHAPPAT, 1994; AL-BAWAB; FRIBERG, 2006).

5.2 Determinação do Tamanho de Partícula

Nanociência é o estudo de fenômenos e manipulação de material em escala atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em maior escala (THE ROYAL SOCIETY AND ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; EUROPEAN COMMISSION, 2012). Uma convenção atual para materiais em nanoescala os define como materiais constituídos por estruturas na escala de comprimento entre 1-100 nm aproximadamente, apresentando novas propriedades em função da sua pequena dimensão (NATIONAL SCIENCE FOUNDATION, 2000). Em relação às nanoemulsões, publicações correntes destacam suas propriedades diferenciadas (brilho azulado, fluidez e estabilidade cinética) quando comparadas às macroemulsões e demonstram alguma flexibilidade ao definir a faixa de distribuição de tamanhos de partículas.

Neste sentido, Mei e colegas (2011) assim como Izquierdo e colegas (2005) descrevem nanoemulsões como sistemas onde o tamanho das partículas está dentro da faixa nanométrica, enquanto Calderó e colegas (2011) descrevem nanoemulsões como emulsões com tamanhos de partículas entre 20-500 nm, Solan e colegas (2005) descrevem que os tamanhos de partículas se encontram entre 20-200 nm e para Bouchemal e colegas (2004) nanoemulsões

são dispersões finas tendo partículas na faixa de 100-600 nm. Além disso, de acordo com Mason e colegas (2006), em geral é aplicada definição mais flexível de nanoemulsão na qual a maioria das partículas são menores do que 100 nm.

A espectroscopia acústica está se desenvolvendo rapidamente como alternativa aos métodos de dispersão de luz. Esta técnica é baseada em fundamentos científicos bem estabelecidos, onde a interação do som com as partículas dispersas proporcionam informação útil. Ela mede a atenuação e/ou velocidade do som e não requer qualquer suposição acerca de propriedades de superfície elétrica. Como resultado, a distribuição de tamanhos de partículas (*PSD*) obtida com espectroscopia acústica é confiável, sendo uma técnica bastante apropriada para este tipo de caracterização (DUKHIN; GOETZ, 1998).

Neste estudo, o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3) foram determinados por meio de espectrômetro acústico (DT-1200, Dispersion Technology Inc., Bedford Hills, NY) ilustrado na Figura 5, usando metodologia previamente descrita no item 4.2.2.

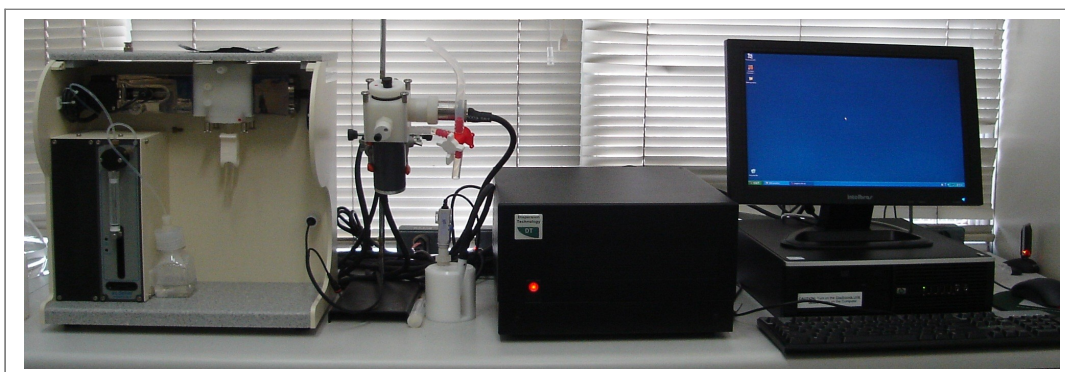


Figura 5 – Espectrômetro acústico (DT-1200, Dispersion Technology Inc., Bedford Hills, NY) utilizado para determinação do tamanho de partícula e da distribuição de tamanhos da nanoemulsão. Foto: Laboratório de Biofísicoquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

O espectrômetro acústico utiliza pulsos sonoros para fazer as medidas. Baseado no efeito combinado de absorção e espalhamento de energia acústica, um sensor acústico mede a atenuação no espectro de frequência da amostra. O sensor utiliza dois transdutores piezoelétricos idênticos, separados por uma distância ajustável que é controlado por um motor sequencial. A distância entre o transmissor e o receptor pode ser ajustada em passos. De forma

padrão, a distância varia de 0,15 nm até 20,0 nm em 21 passos logarítmicos. A frequência básica de pulso muda a cada passo simultaneamente. A frequência muda, de forma padrão, de 3 a 100 Mhz em 18 passos logarítmicos. O número de pulsos coletado para cada distância e frequência é automaticamente ajustado para atingir uma relação sinal/ruído específica. Um programa de análise de cálculo da distribuição de tamanho de partículas (*Particle Size Distribution, PSD*) a partir dos espectros de atenuação foi desenvolvido pelo fabricante. Este programa procura automaticamente o melhor ajuste *PSD* e testa a distribuição de tamanho de partículas normal, log-normal e bimodal (SUN *et al.*, 2006; DUKHIN *et al.*, 2001; DUKHIN; GOETZ, 2002). Uma única medida de tamanho de partículas pode ser rapidamente finalizada em menos de 8 minutos (SUN *et al.*, 2006). O tamanho de partículas típico para tais análises varia de 10,0 nm até 3,0 mm, embora partículas fora desta faixa têm sido medidas com sucesso (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006). Além disso, não é necessário calibração com tamanho de partícula conhecido (DUKHIN; GOETZ, 2002).

A Figura 6 expressa a relação entre distribuição do tamanho de partículas (*PSD, weight basis*) e diâmetro (μm), sendo a distribuição de densidade baseada em peso. Esta representação demonstra o perfil bimodal de distribuição do tamanho de partículas, com média de tamanhos localizada a 10 nm (61%) e 4,5 μm (39%), sendo o desvio padrão igual a 0,13.

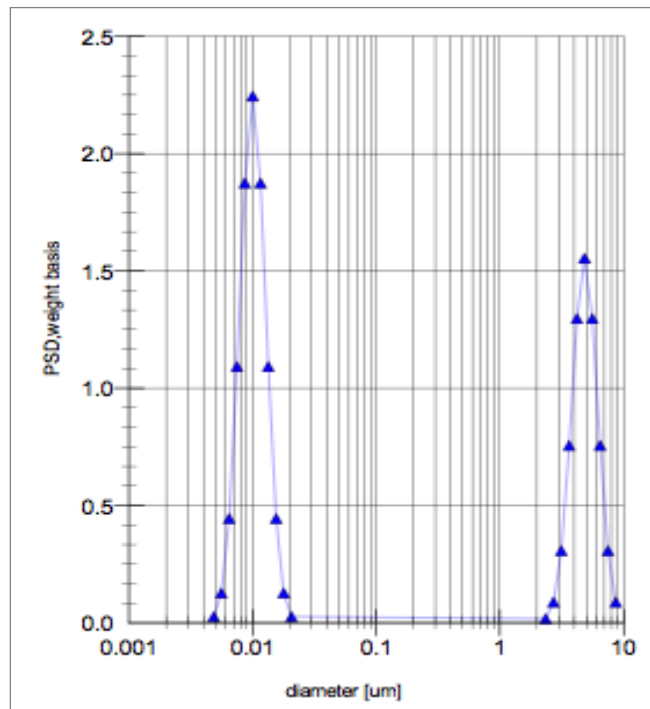


Figura 6 – Perfil bimodal de distribuição do tamanho de partículas, com média de tamanhos localizada por volta de 10 nm (61%) e 4,5 μm (39%)

Em geral, partículas podem ser designadas monodispersas se o desvio padrão for menor do que 0,10 (SUN *et al.*, 2006). Isto significa que a nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3) apresentou partículas polidispersas, sendo a maioria delas com dimensões nanométricas (~10 nm) e, de acordo com Mason e colaboradores (2006), isto pode explicar o aspecto translúcido e brilho azulado.

5.3 Determinação da Eficácia Fotoprotetora *in vitro*

No Brasil, de acordo com a legislação atual, os produtos cosméticos destinados à proteção solar da pele são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual estabelece as definições, os requisitos técnicos, os critérios de rotulagem e os métodos de avaliação de eficácia (BRASIL, 2012).

O fator de proteção solar (FPS), o qual aparece como um valor numérico em produtos de proteção solar, é um indicador universal da performance de fotoproteção contra a radiação

UVB. O FPS é determinado *in vivo* em um grupo de voluntários e obtido pela razão entre a menor dose de energia ultravioleta necessária para produzir um eritema mínimo na pele protegida por um filtro solar e a quantidade de energia necessária para produzir o mesmo eritema sobre uma pele desprotegida. Neste sentido, o FPS indica a habilidade de um produto fotoprotetor para reduzir eritemas causados por radiação UV (HUPEL *et al.*, 2011). Atualmente, o método americano (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1999) e o método europeu (COMITÉ DE LIAISON DES INDUSTRIES DE LA PARFUMERIE, 2006) são os procedimentos *in vivo* mais amplamente usados no mundo para estas determinações, inclusive no Brasil, conforme legislação atual (BRASIL, 2012).

Entretanto, métodos de ensaios *in vitro* também têm sido desenvolvidos por serem mais rápidos, mais baratos e sobretudo porque previnem o envolvimento de voluntários humanos e os problemas éticos relacionados. Estes métodos consistem na medição da transmitância espectral através de um suporte sintético que simula a pele humana sobre o qual é aplicado uma emulsão contendo filtro solar (COMITÉ DE LIAISON DES INDUSTRIES DE LA PARFUMERIE, 2007) ou numa análise espectrofotométrica de uma solução diluída de um produto fotoprotetor (SAYRE *et al.*, 2008; MANSUR *et al.*, 1986). O SPF é determinado por equações matemáticas após medições da radiação UV na faixa espectral de 290 a 400 nm, convencionalmente aceita por dermatologistas para tal determinação (HUPEL *et al.*, 2011).

Neste estudo, a eficácia fotoprotetora *in vitro* da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3) foi medida em espectrofotômetro equipado com detector do tipo esfera de integração (Ultraviolet Transmittance Analyzer, UV2000S, Labsphere, US) ilustrado na Figura 7.



Figura 7 – Espectrofotômetro equipado com detector tipo esfera de integração (Ultraviolet Transmittance Analyzer, UV2000S, Labsphere, US) usado para avaliação *in vitro* da proteção solar da nanoemulsão. Foto: Laboratório de Cosmetologia, Universidade de São Paulo

Em um espectrofotômetro, um raio de luz incidente sobre uma amostra do protetor solar será espalhada e a luz que não for transmitida será refletida ou absorvida. A razão entre o total de luz transmitida e de luz incidente é conhecida como transmitância, uma quantidade mensurável. Transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração para coletar a luz espalhada em todos os ângulos. Um fotodetector responde proporcionalmente a iluminação interna produzida na parede da esfera (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Dessa forma, o espectro de absorbância UV foi determinado neste estudo por meio das medidas previamente estabelecidas, em nove diferentes pontos do substrato, conforme metodologia descrita no item 4.2.3. A Figura 8, expressa a relação absorbância e comprimento de onda na faixa de 290 a 440 nm da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3).

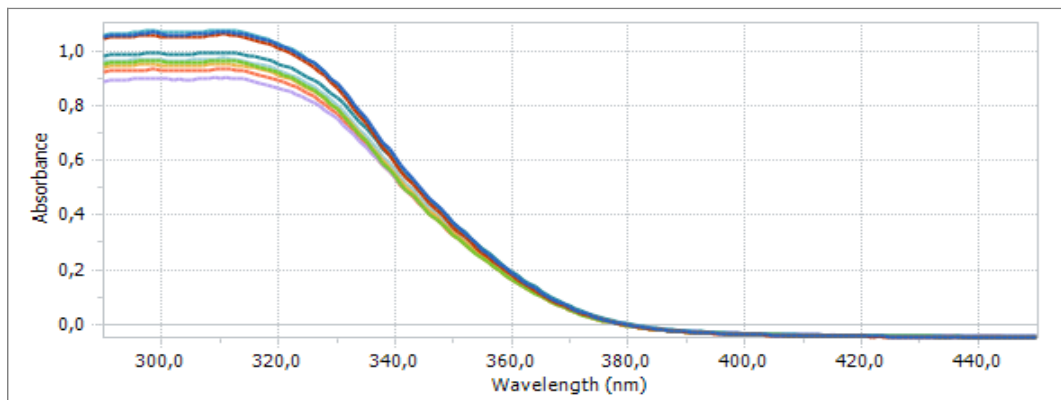


Figura 8 – Espectro de absorbância UV da nanoemulsão, demonstrando a absorbância UV na faixa UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) em nove diferentes pontos do substrato

De acordo com o espectro de absorbância UV (Figura 8), a maior parte da radiação foi absorvida entre 290 e 345 nm. Uma queda acentuada no espectro após 320 nm demonstrou que grande parte da radiação foi absorvida dentro da faixa UVB (290-320 nm), enquanto pequena parte foi absorvida dentro da faixa UVA (320-400 nm). Para fins de determinação da eficácia fotoprotetora, apenas a quantidade de radiação absorvida na faixa UVB é expressiva, o que significa que a nanoemulsão avaliada foi eficaz somente na absorção da radiação UVB.

As radiações UVA e UVB são responsáveis por um equilíbrio entre ativação e inibição do sistema antioxidante por diferentes mecanismos, resultando na alteração homeostase da pele.

A radiação UVB é responsável pelo dano imediato causado pela radiação solar devido à sua alta energia, enquanto a radiação UVA induz a séries de alterações celulares envolvendo fibroblastos e melanócitos devido à sua profunda penetração na pele (FLORA; FERGUSON, 2005). A radiação UVB é responsável por 80-90% das queimaduras de sol. Neste sentido, a medição do fator de proteção solar (FPS) à indução de eritema é um fator de medição essencialmente relacionado a proteção UVB de uma formulação fotoprotetora (MAIER; KORTING, 2005). A transmitância espectral de um protetor solar na faixa ultravioleta (UV) pode ser usada para prever o valor de FPS *in vitro*. Da mesma forma, o comprimento de onda crítico (λ_c) e a razão UVA/UVB, obtidos a partir de dados espectrofotométricos, são usados para categorizar a eficácia de absorvedores UVA (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Sendo assim, com base no espectro de absorbância UV (Figura 8), os valores médios do FPS *in vitro*, comprimento de onda crítico (λ_c) e razão UVA/UVB da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3) foram calculados automaticamente pelo equipamento e os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros medidos na determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* da nanoemulsão

Parâmetro Avaliado	Valor Medido
FPS <i>in vitro</i>	8,0 ± 0,9
λ_c	345,0 ± 0,4
Razão UVA/UVB	0,304

Legenda – FPS: Fator de Proteção Solar; λ_c : comprimento de onda crítico

Por definição, o FPS é um valor determinado *in vivo* conforme aumenta o tempo requerido de exposição para induzir ao eritema. Todavia, medindo a transmitância espectral na faixa de comprimentos de onda UV entre 290 e 400 nm é uma técnica *in vitro* comum para estimar o valor de FPS (DIFFEY; ROBSON, 1989). Neste caso, o cálculo é executado automaticamente pelo equipamento (Equação 1).

$$SPF = \frac{\int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} E_{\lambda} S_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde E_λ é eficácia espectral de eritema, S_λ é a irradiância espectral solar e T_λ é a transmitância espectral da amostra (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). Neste estudo, o FPS *in vitro* médio da nanoemulsão avaliada foi $8,0 \pm 0,9$.

Uma preocupação recente com o sistema de classificação para protetores solares é o fato dele ser baseado no eritema como um ponto final. A razão UVA/UVB é uma indicação para descrever a proteção UVA oferecida adicionalmente ao FPS. Para calcular este parâmetro, os valores de transmitância espectral, T_λ , são convertidos em valores de absorbância espectral, $A_\lambda = -\log(T_\lambda)$. Um termo denominado “razão UVA” é automaticamente calculado, o qual é a razão da absorção total UVA em relação a UVB (Equação 2) (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$\frac{\alpha_{UVA}}{\alpha_{UVB}} = \frac{\int_{320\text{nm}}^{400\text{nm}} A_\lambda d_\lambda}{\int_{290\text{nm}}^{320\text{nm}} A_\lambda d_\lambda} \quad (\text{Equação 2})$$

O potencial de proteção UVA é classificado de acordo com o valor da razão UVA/UVB, como a seguir: “muito baixo” (< 0.2), “moderado” ($0.2 \text{ to } < 0.4$), “Bom” ($0.4 \text{ to } < 0.6$), “superior” ($0.6 \text{ to } < 0.8$), “máximo” (≥ 0.8) (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). Neste estudo, a razão UVA/UVB média da nanoemulsão avaliada foi 0,304. Assim, de acordo com a classificação de Springsteen e colegas (1999), isto significa que a nanoemulsão avaliada apresentou potencial de proteção UVA “moderado”, não alcançando o potencial de “amplo espectro”.

Um parâmetro alternativo para indicar se o produto oferece proteção de amplo espectro é baseado em um número chamado comprimento de onda crítico (λ_c), o qual é determinado por meio de espectrofotometria, a partir do espectro de absorbância. Para obter este número, o espectro de transmitância é medido, T_λ , e convertido em valores de absorbância espectral $A_\lambda = -\log(T_\lambda)$. Uma razão é automaticamente calculada conforme a seguir, a qual determina a absorção total em incrementos de bandas de comprimento de onda e compara com a absorção UV total. A razão registrada para cada comprimento de onda, λ , é demonstrada na Equação 3.

$$R = \frac{\int_{290\text{nm}}^{\lambda} A_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} A_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Equação 3})$$

O comprimento de onda crítico (λ_c) corresponde a 90% ou mais da curva de integração da absorvância. O potencial de proteção UVA é descrito como “intermediário” ($340 < \lambda_c < 370$ nm) e “amplo espectro” ($\lambda_c > 370$ nm) (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). Neste estudo, o comprimento de onda crítico (λ_c) médio da nanoemulsão avaliada foi equivalente a $345,0 \pm 0,4$. De acordo com a classificação de Springsteen e colegas (1999), isto significa que a nanoemulsão avaliada apresentou potencial de proteção UVA “intermediário”, não alcançando o potencial de “amplo espectro”.

De acordo com os resultados obtidos na determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (Tabela 6), o perfil de eficácia da nanoemulsão obtida inicialmente (Tabela 3), apresentou FPS igual a $8,0 \pm 0,9$ e potencial de proteção UVA “moderado” (razão UVA/UVB = 0,304) e “intermediário” ($\lambda_c = 345 \pm 0,4$), não alcançando o potencial de “amplo espectro”.

5.4 Influência das Variáveis no Processo de Desenvolvimento da Nanoemulsão

A análise estatística é uma ferramenta indispensável na pesquisa científica para a devida exploração e o correto entendimento das informações e dados gerados (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2002; CUNICO *et al.*, 2008). Uma reflexão deve ser realizada no início de cada pesquisa científica, para a definição das condições experimentais, que permitam a aquisição de resultados confiáveis, já que a otimização de parâmetros experimentais de relevância é considerada como uma das etapas mais críticas do trabalho científico (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005; CUNICO *et al.*, 2008).

Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (BARROS NETO *et al.*, 1996; CUNICO *et al.*, 2008).

5.4.1 Influência das Variáveis na Temperatura de Inversão de Fases (*PIT*)

Neste estudo, foi analisado a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na *PIT* da nanoemulsão. Primeiramente foi determinado a *PIT* de todas as amostras do planejamento experimental e os resultados foram organizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de *PIT* determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3³, o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na *PIT* da nanoemulsão

Amostra	Variáveis			<i>PIT</i> (°C)
	Agitação (rpm)	Glicerina (% p/p)	NaCl (% p/p)	
1	800	15	2	59,0
2	800	10	3	61,0
3	400	10	2	66,0
4	400	5	2	67,0
5	800	15	1	66,0
6	800	5	3	64,0
7	600	5	3	64,0
8	400	15	2	62,0
9	400	5	1	72,0
10	600	10	1	69,0
11	400	15	3	60,0
12	600	5	2	65,0
13	800	10	2	62,0
14	400	10	3	59,0
15	600	15	3	57,0
16	800	10	1	66,0
17	600	15	1	67,0
18	600	5	1	69,0
19	400	5	3	66,0
20	400	15	1	67,0
21	800	5	2	68,0
22	600	15	2	62,0
23	800	15	3	58,0
24	800	5	1	65,0
25	400	10	1	67,0
26	600	10	2	65,0
27	600	10	3	56,0

Em seguida, foi realizada análise estatística correlacionando as variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) com os valores de *PIT* (Tabela 7). Os resultados foram organizados em gráficos normal de efeito padronizado (Figura 9), diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 10) e gráficos de resíduos (Figura 11). Demais valores estatísticos podem ser encontrados no Anexo A.

Em um gráfico de probabilidade normal dos efeitos, os pontos que aparecem distantes da linha significam efeitos importantes. Estes efeitos são maiores e mais afastados da linha do que os efeitos insignificantes, que tendem a ser menores e mais centralizados próximo do zero (MINITAB, 2007).

O gráfico normal dos efeitos padronizados (Figura 9) demonstrou que os fatores A ($p = 0,041$), B ($p < 0,001$) e C ($p < 0,001$) foram significantes em relação a *PIT*. Isso indicou que as variáveis analisadas influenciaram a *PIT* da nanoemulsão.

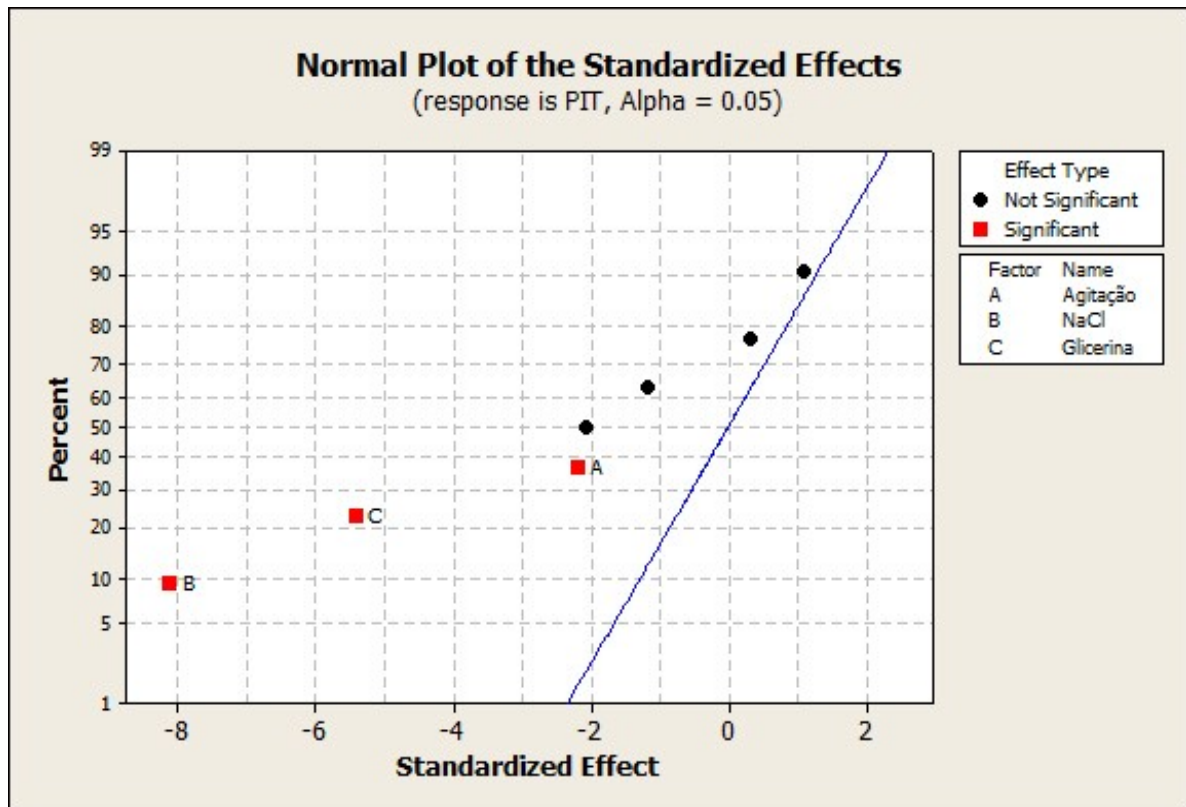


Figura 9 – Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são significantes quando correlacionados com a *PIT*

O diagrama de Pareto dos efeitos padronizados é usado para determinar a magnitude e a importância de um efeito. Este tipo de diagrama mostra o valor absoluto do efeito e desenha uma linha de referência. Qualquer efeito que ultrapasse esta linha de referência é potencialmente importante (MINITAB, 2007).

O diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 10) demonstrou que os fatores A ($p = 0,041$), B ($p < 0,001$) e C ($p < 0,001$) foram significantes em relação a *PIT* enquanto que os fatores BC ($p = 0,054$), ABC ($p = 0,260$), AB ($p = 0,282$) e AC ($p = 0,755$) foram insignificantes. Isso indicou que as variáveis analisadas influenciaram a *PIT* da nanoemulsão de forma que a concentração de NaCl (B) teve maior influência, seguida pela concentração de glicerina (C) e pela velocidade de agitação (A), sendo que a combinação das variáveis (BC, ABC, AB e AC) não exerceu influência adicional sobre a *PIT*.

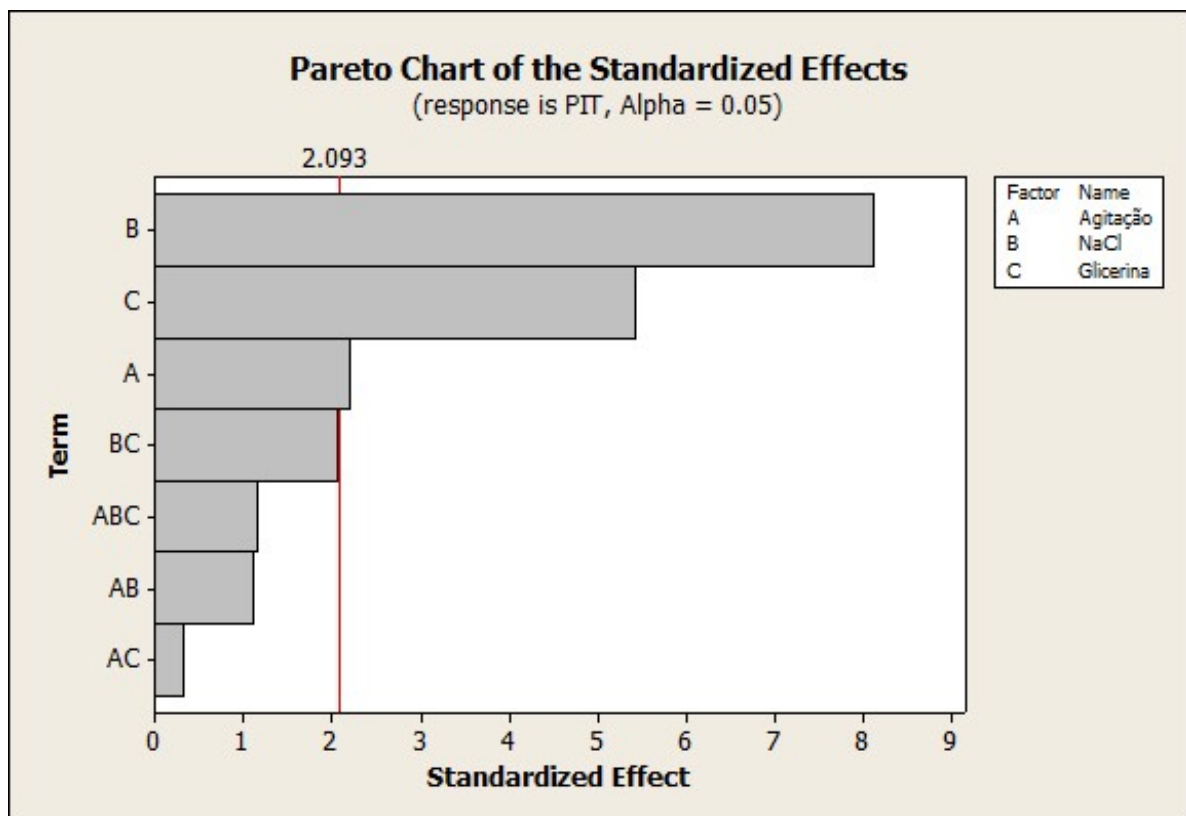


Figura 10 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores A, B e C são significantes quando correlacionados com a *PIT* enquanto que os fatores BC, ABC, AB, AC são insignificantes. O fator B tem maior influência, seguido por C e por A respectivamente

Os gráficos de resíduos são usados para examinar a qualidade do ajuste do modelo de regressão. Alguns gráficos de resíduos amplamente usados são: gráfico de probabilidade normal, histograma dos resíduos, resíduos versus valores ajustados e resíduos versus ordem (MINITAB, 2007).

No gráfico de probabilidade normal, os pontos formam uma linha reta se os resíduos são normalmente distribuídos. Se os pontos neste gráfico se afastarem de uma linha reta, a suposição de normalidade pode ser inválida. O histograma dos resíduos é uma ferramenta exploratória para mostrar as características gerais dos resíduos, incluindo os valores típicos, propagação, e forma. A cauda longa de um lado pode indicar uma distribuição assimétrica. Se uma ou duas barras estão longe dos outros pontos, podem ser *outliers*. O gráfico de resíduos versus valores ajustados deve mostrar um padrão aleatório de resíduos em torno do zero. Se um ponto está longe da maioria dos pontos, pode ser um *outlier*. Não deve haver quaisquer padrões reconhecíveis no gráfico residual. Por exemplo, se a propagação de valores residuais tendem a aumentar à medida que o aumento dos valores ajustado, então este pode estar violando a suposição de variância constante. No gráfico de resíduos versus ordem os resíduos não devem apresentar um padrão aparente. Trata-se de um gráfico de todos os resíduos na ordem em que os dados foram recolhidos e podem ser usados para encontrar erros não aleatórios, especialmente relacionados com o tempo. Este gráfico ajuda a verificar a hipótese de que os resíduos não são correlacionados uns com os outros (MINITAB, 2007).

Os quatro gráficos de resíduos (Figura 11) para a *PIT* demonstraram que o modelo de regressão foi adequado e não indicaram violação das suposições estatísticas. O gráfico de probabilidade normal indicou que os resíduos foram normalmente distribuídos. O histograma de resíduos indicou a normalidade aparente da distribuição. O gráfico de resíduos versus ordem indicou que os resíduos não foram correlacionados uns com os outros e não houve dependência em relação a ordem. O gráfico de resíduos versus valores ajustados indicou variância constante.

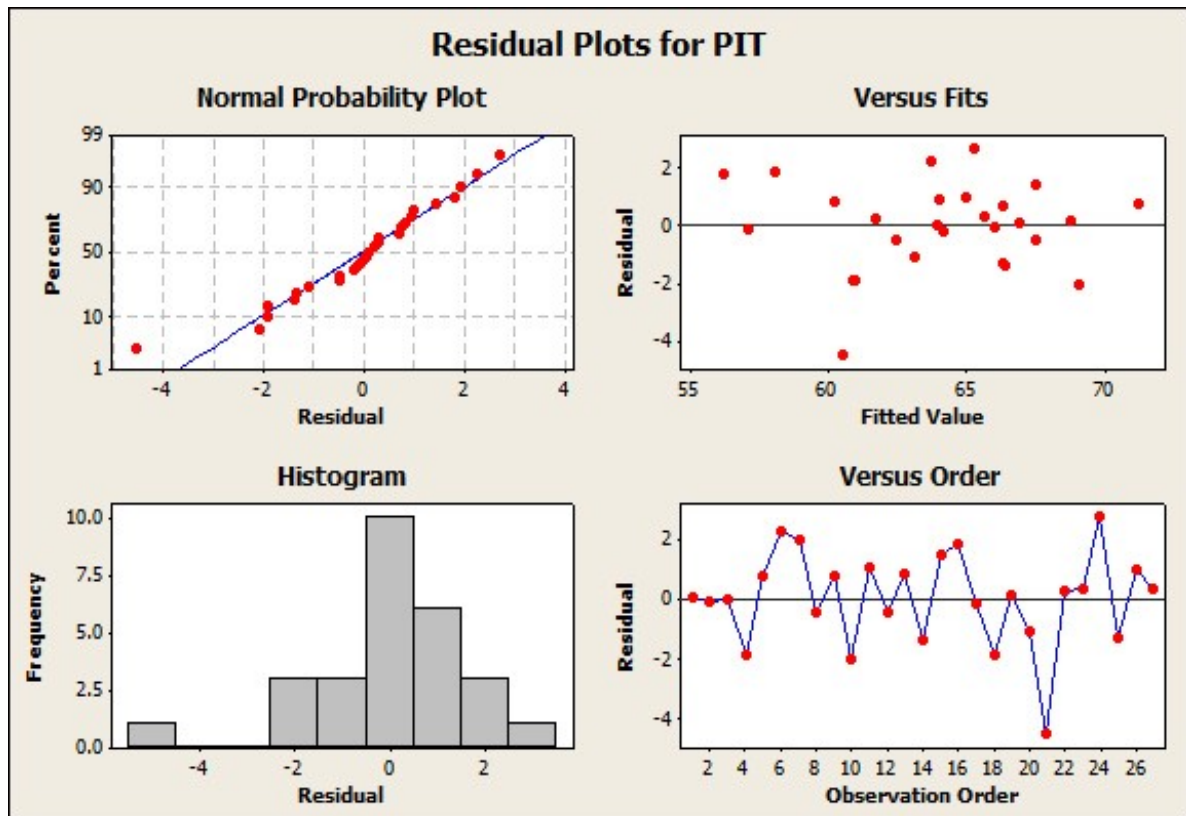


Figura 11 – Gráficos de resíduos para a *PIT*. Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos não indicam violação das suposições estatísticas

5.4.2 Influência das Variáveis no Tamanho de Partícula

Foi analisado a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) no tamanho de partícula da nanoemulsão. Primeiramente foi determinado o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de todas as amostras do planejamento experimental e os resultados foram organizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de tamanhos de partículas (perfil bimodal) determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3^3 , o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) no tamanho de partícula da nanoemulsão

Amostra	Variáveis			Tamanho 1 (μm)	Tamanho 2 (μm)	vrf2/vrf
	Agitação (rpm)	Glicerina (% p/p)	NaCl (% p/p)			
1	800	15	2	0,639	1,331	0,24
2	800	10	3	0,368	9,358	0,61
3	400	10	2	0,010	2,915	0,42
4	400	5	2	0,011	5,389	0,66
5	800	15	1	0,026	4,529	0,62
6	800	5	3	0,010	6,283	0,75
7	600	5	3	0,010	4,876	0,60
8	400	15	2	0,050	9,422	0,63
9	400	5	1	0,010	4,635	0,43
10	600	10	1	0,010	2,593	0,33
11	400	15	3	0,011	1,702	0,30
12	600	5	2	0,010	5,457	0,79
13	800	10	2	0,011	2,163	0,30
14	400	10	3	0,011	3,519	0,39
15	600	15	3	0,010	0,586	0,10
16	800	10	1	0,011	1,572	0,19
17	600	15	1	0,774	5,878	0,41
18	600	5	1	0,768	2,079	0,45
19	400	5	3	0,010	3,178	0,70
20	400	15	1	0,109	9,315	0,91
21	800	5	2	0,092	9,153	0,91
22	600	15	2	0,120	8,951	0,91
23	800	15	3	0,258	0,275	0,01
24	800	5	1	0,054	3,971	0,60
25	400	10	1	0,101	11,475	0,89
26	600	10	2	0,091	9,720	0,90
27	600	10	3	0,101	8,885	0,89

Legenda – vrf2/vrf: fração do Tamanho 2 em relação ao Tamanho 1

Em seguida, foi realizada análise estatística correlacionando as variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) com os valores de tamanhos de partículas (Tamanho 1; Tabela 8). Os resultados foram organizados em gráficos normal de efeito padronizado (Figura 12), diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 13) e gráficos de resíduos (Figura 14). Demais valores estatísticos podem ser encontrados no Anexo B.

O gráfico normal dos efeitos padronizados (Figura 12) demonstrou que os fatores A ($p = 0,271$), B ($p = 0,324$) e C ($p = 0,325$) foram insignificantes em relação ao tamanho de partícula. Isso indicou que as variáveis analisadas não influenciaram o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos da nanoemulsão.

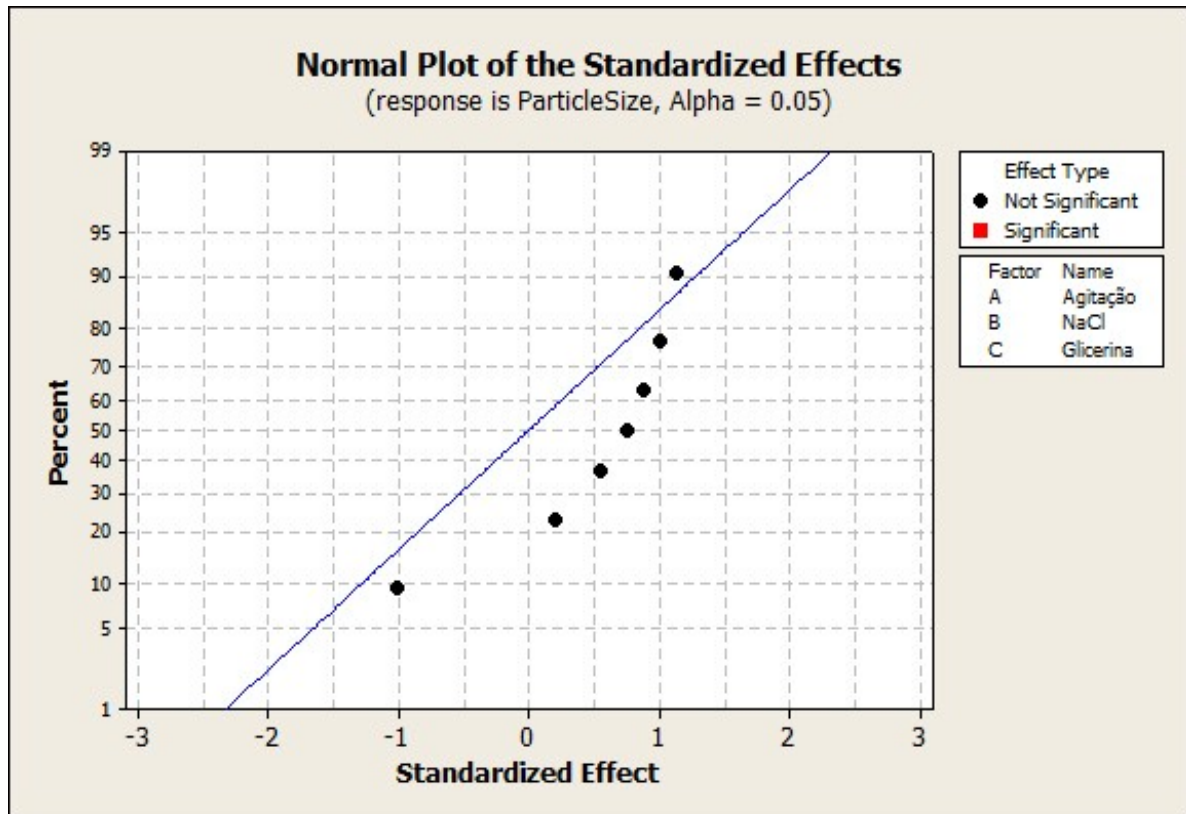


Figura 12 – Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são insignificantes quando correlacionados com o tamanho de partícula

O diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 13) demonstrou que os fatores A ($p = 0,271$), B ($p = 0,324$), C ($p = 0,325$), AB ($p = 0,386$), AC ($p = 0,456$), ABC ($0,585$), BC ($0,837$) foram insignificantes em relação ao tamanho de partícula. Isso indicou que as variáveis analisadas não influenciaram o tamanho de partícula da nanoemulsão.

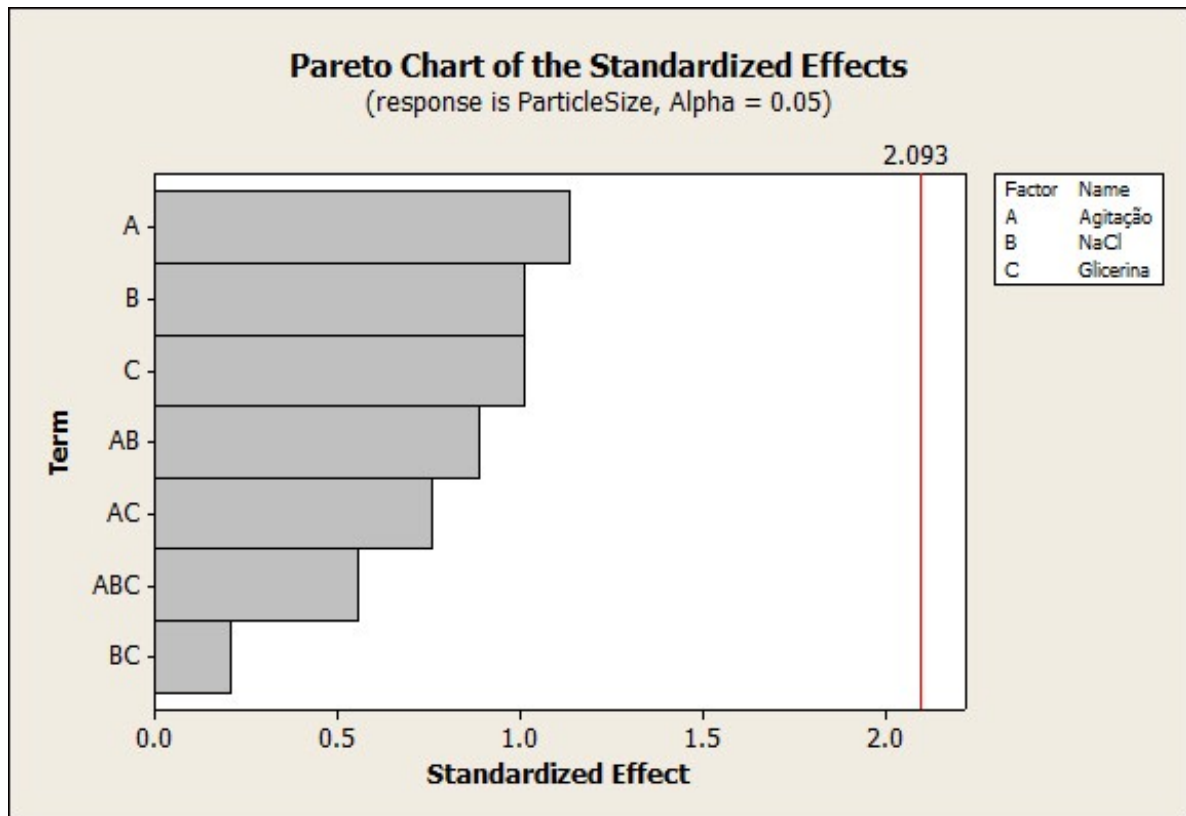


Figura 13 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores A, B, C, AB, AC, ABC e BC são insignificantes quando correlacionados com o tamanho de partícula

Os quatro gráficos de resíduos (Figura 14) para o tamanho de partícula demonstram que o modelo de regressão foi adequado e que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam. O gráfico de probabilidade normal indicou não-normalidade na distribuição, uma vez que os pontos se afastaram da linha reta. No histograma de resíduos foi observado a presença de cauda longa, o que indicou distribuição assimétrica e a não-normalidade da distribuição. O gráfico de resíduos versus valores ajustados indicou variância potencialmente correlacionada. O gráfico de resíduos versus ordem indicou que os resíduos podem estar correlacionados uns com os outros e pode haver dependência em relação a ordem.

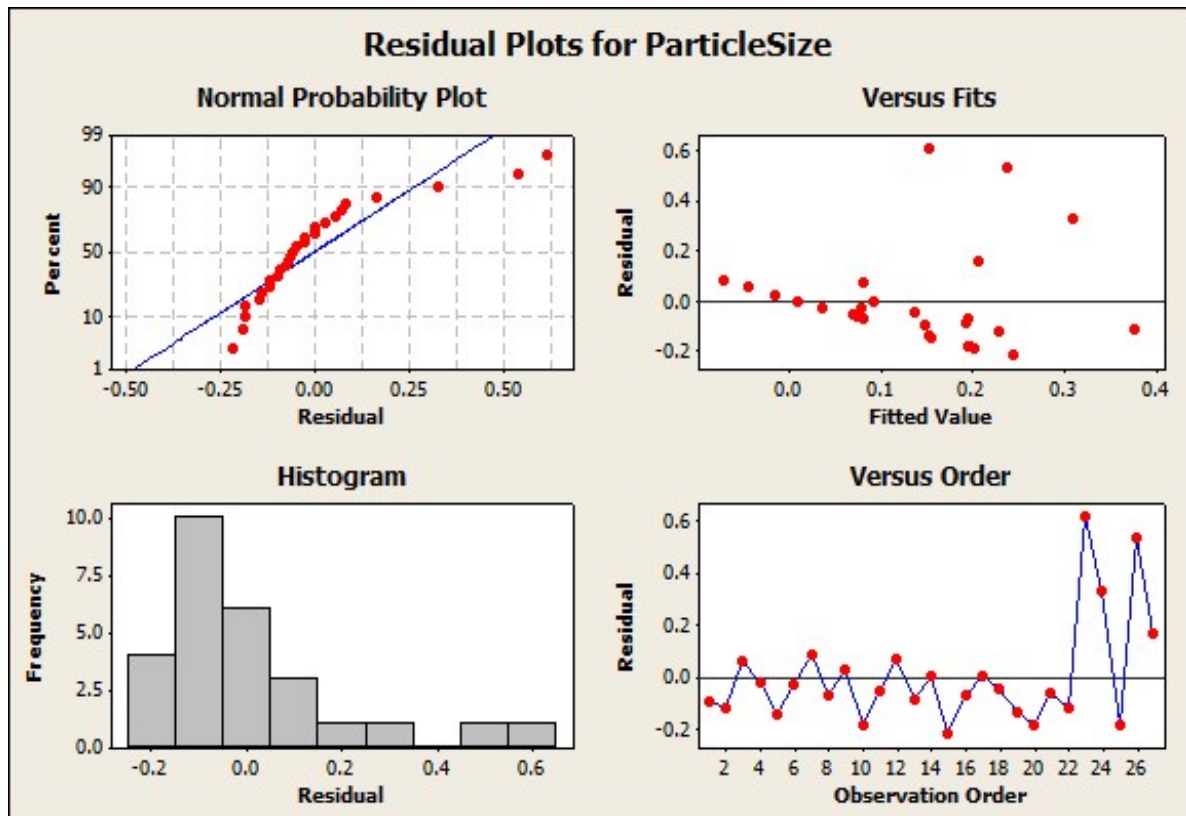


Figura 14 – Gráficos de resíduos para o tamanho de partícula. Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos mostram que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam

5.4.3 Influência das Variáveis na Eficácia Fotoprotetora *in vitro*

Foi analisado a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na eficácia fotoprotetora *in vitro* da nanoemulsão. Primeiramente foi determinado o FPS de todas as amostras do planejamento experimental e os resultados foram organizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de FPS determinados nas amostras do planejamento experimental do tipo fatorial 3³, o qual estudou a influência das variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) na eficácia fotoprotetora *in vitro* da nanoemulsão

Amostra	Variáveis			FPS
	Agitação (rpm)	Glicerina (% p/p)	NaCl (% p/p)	
1	800	15	2	8
2	800	10	3	8
3	400	10	2	7
4	400	5	2	8
5	800	15	1	8
6	800	5	3	7
7	600	5	3	8
8	400	15	2	8
9	400	5	1	8
10	600	10	1	9
11	400	15	3	13
12	600	5	2	7
13	800	10	2	13
14	400	10	3	9
15	600	15	3	19
16	800	10	1	12
17	600	15	1	11
18	600	5	1	14
19	400	5	3	14
20	400	15	1	12
21	800	5	2	10
22	600	15	2	12
23	800	15	3	10
24	800	5	1	9
25	400	10	1	7
26	600	10	2	8
27	600	10	3	7

Em seguida, foi realizada análise estatística correlacionando as variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) com os valores de FPS (Tabela 9). Os resultados foram organizados em gráficos normal de efeito padronizado (Figura 15), diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 16) e gráficos de resíduos (Figura 17). Demais valores estatísticos podem ser encontrados no Anexo C.

O gráfico normal dos efeitos padronizados (Figura 15) demonstrou que os fatores A ($p =$

0,938), B (0,697) e C ($p = 0,221$) foram insignificantes em relação ao FPS. Isso indicou que as variáveis analisadas não influenciaram o FPS da nanoemulsão.

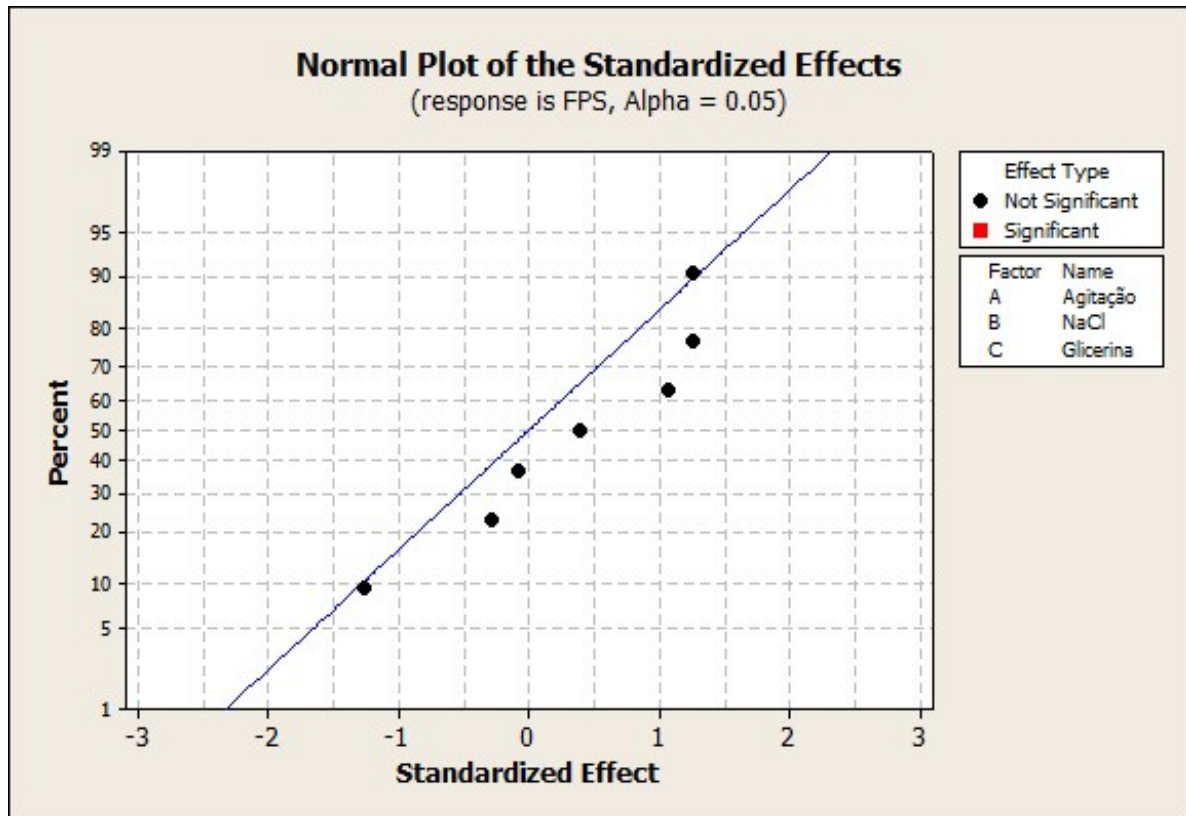


Figura 15 – Gráfico normal dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental, onde é possível observar que os fatores A, B e C são insignificantes quando correlacionados com o FPS

O diagrama de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 16) demonstrou que os fatores C ($p = 0,221$), BC ($p = 0,223$), AB ($p = 0,223$), ABC ($p = 0,299$), B ($p = 0,697$), AC ($p = 0,774$) e A ($p = 0,938$) foram insignificantes em relação ao FPS. Isso indicou que as variáveis analisadas não influenciaram o FPS da nanoemulsão.

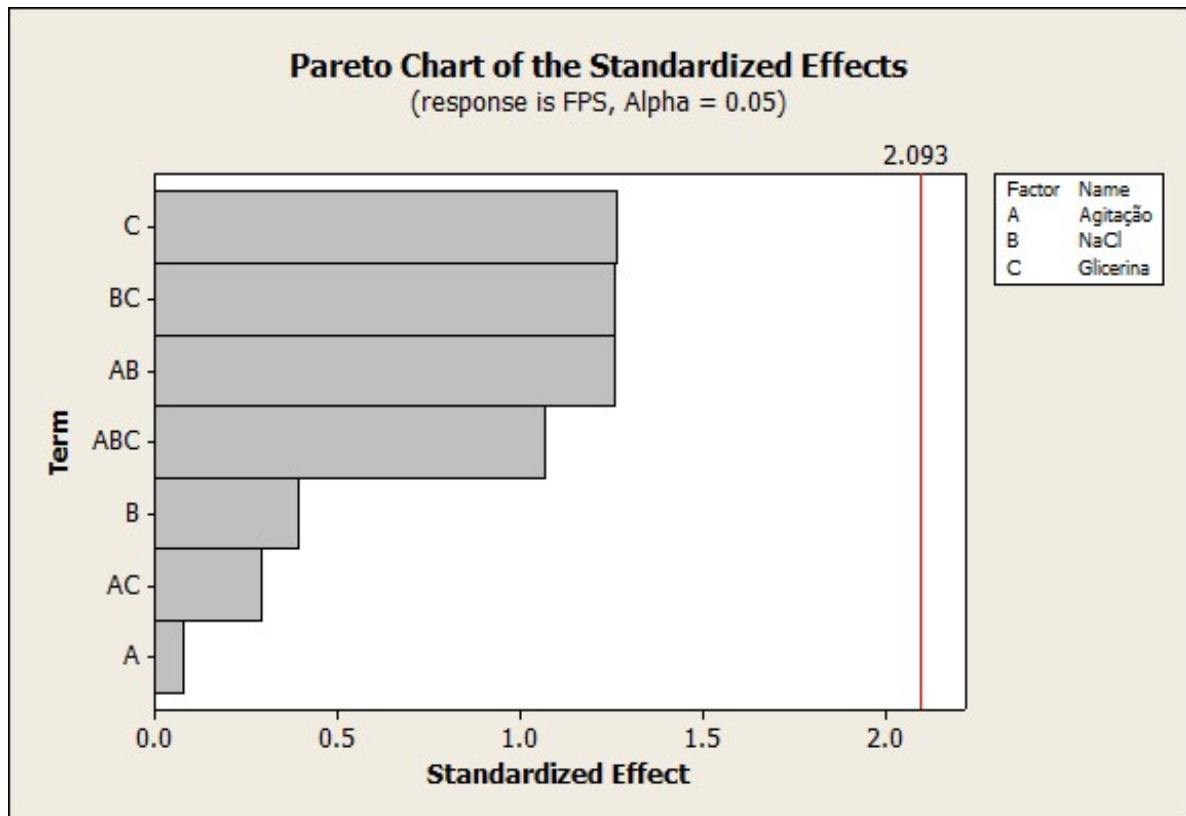


Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, obtido com dados das amostras do planejamento experimental. Os fatores C, BC, AB, ABC, B, AC e A são insignificantes quando correlacionados com o fator de proteção solar (FPS)

Os quatro gráficos de resíduos (Figura 17) para o FPS demonstram que o modelo de regressão foi adequado e que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam. O gráfico de probabilidade normal indicou não-normalidade na distribuição, uma vez que os pontos se afastaram da linha reta. O histograma de resíduos indicou distribuição assimétrica e a não-normalidade da distribuição. O gráfico de resíduos versus ordem indicou que os resíduos podem estar correlacionados uns com os outros e pode haver dependência em relação a ordem. O gráfico de resíduos versus valores ajustados indicou variância potencialmente correlacionada.

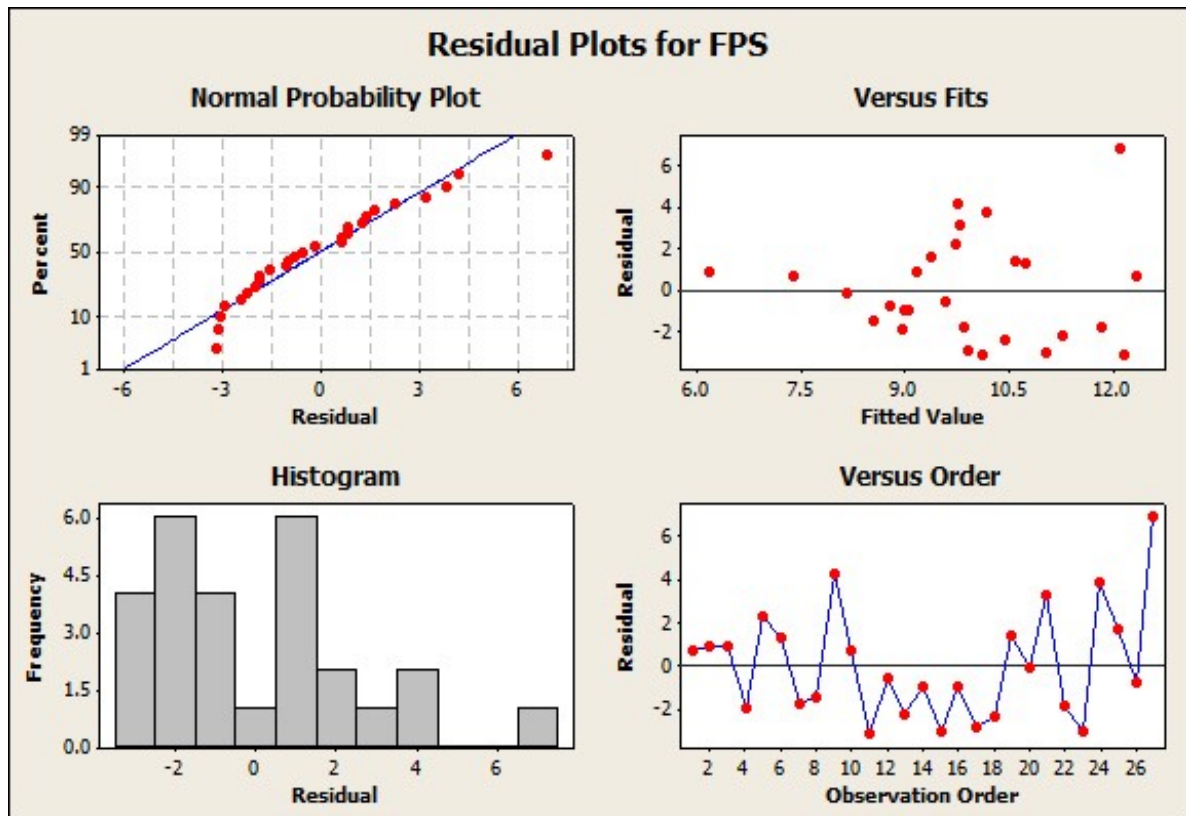


Figura 17 – Gráficos de resíduos para o FPS. Em sentido anti-horário: gráfico de probabilidade normal, histograma, resíduos versus ordem, resíduos versus valores ajustados. Os quatro gráficos mostram que neste estudo as suposições estatísticas não se aplicam

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, nas condições experimentais adotadas, foi desenvolvida nanoemulsão contendo os compostos ativos *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3.

Por meio do método da condutividade elétrica foi determinada a *PIT* (72,0°C) da nanoemulsão, a qual apresentou brilho azulado e fluidez, além de estabilidade por mais de 90 dias quando armazenada em temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C).

A distribuição de tamanhos de partículas (*PSD*) apresentou perfil bimodal com médias de tamanhos próximas de 10 nm (61%) and 4,5 µm (39%).

A avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* apresentou FPS igual a 8,0 ± 0,9 e potencial de proteção UVA “moderado” (razão UVA/UVB = 0,304) e “intermediário” ($\lambda_c = 345 \pm 0,4$), não alcançando o potencial de “amplo espectro”.

A análise estatística demonstrou que as variáveis (velocidade de agitação, concentração de glicerina e de cloreto de sódio) influenciaram a *PIT* da nanoemulsão, mas não influenciaram o tamanho de partícula nem a eficácia fotoprotetora *in vitro*. Sendo que, a concentração de NaCl (B) teve maior influência sobre a *PIT*, seguida pela concentração de glicerina (C) e pela velocidade de agitação (A).

REFERÊNCIAS*

4TH NANOFORUM. **Benefits, Risks, Ethical, Legal and Social Aspects of Nanotechnology**; Parte 3: Potential risks of nanotechnologies. **Report**. European Community, 2005.

ABI COSMÉTICA. Disponível em: <<http://www.abicosmetica.com.br/empresas.php?q=cosmeticos>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Guia Para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília, DF, 2003.

AL-BAWAB, A.; FRIBERG, S. E. Some pertinent factors in skin care emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.123-126, p.313-322, 2006.

ANDREASSI, M. Sunscreens and photoprotection. **Expert Rev Dermatol**, v.6, n.5, p.433-435, 2011.

ANSEL, M. C; POPOVICH, N. G; ALLEN, L. V. J. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de liberação de fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editora Premier, 2000. 568p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299p.

BECHER, P. **Encyclopedia of Emulsion Technology**. New York: Marcel Dekker, 1983. v.1, 725p.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G.F. Evaluation of dissolution kinetics of hydrophilic polymers by use of acoustic spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.377, p.153-158, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos. Resolução RDC nº 47, de 16 de março de 2006. **Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos. Resolução RDC nº 30, de 1º de junho de 2012. **Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 jun. 2012.

CALDERÓ, G.; GARCIA-CELMA, M. J.; SOLANS, C. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. **Journal of Colloid and Interface Sciences**, v.353, p.406-411, 2011.

CAPEK, I. Degradation of Kinetically-Stable O/W Emulsions. **Advances in Colloid Interface Science**, v.107, p.125-155, 2004.

CHAPPAT, M. Some applications of emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.91, p.57-77, 1994.

COMITÉ DE LIAISON DES INDUSTRIES DE LA PARFUMERIE. COLIPA. **Guidelines: International Sun Protection Factor (SPF) Test Method**. Brussels, 2006. Disponível em: <<http://www.colipa.eu>>. Acesso em: 21 mar. 2011.

COMITÉ DE LIAISON DES INDUSTRIES DE LA PARFUMERIE. COLIPA. **Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products**. Brussels, 2007. Disponível em: <<http://www.colipa.eu>>. Acesso em: 17 set. 2011.

COUTEAU, C.; FAURE A.; FORTIN J.; PAPARIS EVA.; COIFFARD L. J. M. Study of the photostability of 18 sunscreens in creams by measuring the SPF *in vitro*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.270-273, 2007.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento Fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v.9, n.1, p.23-32, 2008.

DARVAY, A.; WHITE, I. R.; RYCROFT, R. J.; JONES, A. B.; HAWK, J. L.; McFADDEN, J. P. Photoallergic contact dermatitis is uncommon. **British Journal of Dermatology**, v.145, p.597-601, 2001.

DIFFEY, B. L.; ROBSON J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.40, p.127-133, 1989.

DUKHIN, A. S.; GOETZ, P. J. Characterization of aggregation phenomena by means of acoustic and electroacoustic spectroscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.144, p.49-58, 1998.

DUKHIN, A. S.; GOETZ, P. J. **Ultrasound for characterizing colloids**: particle sizing, zeta potential, rheology. New York: Elsevier Science, 2002. 372 p.

DUKHIN, A. S.; GOETZ, P. J.; TRUESDAIL, S. Titration of concentrated dispersions using electroacoustic zeta potential probe. **Langmuir**, v.17, p.964-968, 2001.

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

EUROPEAN COMMISSION. **Towards a European Strategy for Nanotechnology**. Brussels, 2004. Disponível em: <<http://cordis.europa.eu/nanotechnology/actionplan.htm>>. Acesso em: 24 mai. 2010.

EUROPEAN COMMISSION. **Nanotechnology**: Introduction. Brussels, 2012. Disponível em: <http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html>. Acesso em: 13 dez. 2012.

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

FERRERO, L.; PISSAVINI, M.; DEHAIS, A.; MARGUERIE, S.; ZASTROW, L. Importance of substrate roughness for *in vitro* sun protection assessment. **International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Magazine**, v.9, n.2, 2006.

FERRERO, L.; PISSAVINI, M.; DOUCET, O. How a calculated model of sunscreen film geometry can explain *in vitro* and *in vivo* SPF variation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, p.540-551, 2010.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v.591, n.1-2, p.8-15, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. Federal Register, 21CFR 310, 352, 700 and 740. Department of Health and Human Service. **Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use**; Final Monograph. Rockville, MD, 1999. 27p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/052199b.txt>>. Acesso em: 19 set. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. **Guidance for industry: safety of nanomaterials in cosmetic products**; Draft Guidance. Rockville, MD, 2012.

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

FRONZA, T.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 64 p.

GUMIERO, V. C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão à base de óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*) e extratos vegetais (*Areca catechu*, *Glycyrrhiza glabra* e *Portulaca oleracea*) para uso pós-sol**. 2011. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

HUPEL, M.; POUPART, N.; GALL, E. A. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, v.86, p.362-371, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO. ISO20998-1. **Measurement and characterization of particles by acoustic methods**; Part 1: Concepts and procedures in ultrasonic attenuation spectroscopy. Switzerland, 2006. Disponível em: <<http://www.iso.org>>. Acesso em: 14 ago. 2011.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, Th. F.; DEDEREN, C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method, **Langmuir**, v.18, p.26-30, 2002.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, Th. F.; DEDEREN, J. C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the PIT method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.285, p.388-394, 2005.

JANJUA, N. R.; KONGSHOJ, B.; ANDERSSON, A. M.; WULF, H. C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.22, p.456-461, 2008.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, p.937-958, 2005.

LIN EE, S.; DUAN, X.; LIEW, J.; DZUY, N. Q. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. **Chemical Engineering Journal**, v.140, p.626-631, 2008.

MAIER, T.; KORTING, H. C. Sunscreens – which and what for? **Skin Pharmacology and Physiology**, v.18, n.6, p.253-262, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.4, p.121-124, 1986.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v.18, p.635-666, 2006.

MEI, Z.; XU, J.; SUN, D. O/W nano-emulsions with tunable PIT induced by inorganic salts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v.375, p.102-108, 2011.

MERCK. **The Merck Index**: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Whitehouse Station: Merck & Co., 2001. 2520 p.

MINITAB. **Meet Minitab 15**; for Windows. USA, 2007. 142 p. Disponível em: <<http://www.minitab.com/pt-BR/support/documentation/minitab/getting-started.aspx>>. Acesso em: 14 nov. 2012.

MORABITO, K.; SHAPLEY, N. C.; STEELEY, K. G.; TRIPATHI, A. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. **International Journal of Cosmetic Science**, v.33, p.385-390, 2011.

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

NATIONAL SCIENCE FOUNDATION. **Nanotechnology definition**. Virginia, USA, 2000. Disponível em: <http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp>. Acesso em: 04 mar. 2010.

NIKOLIC, S.; KECK, C. M.; ANSEMI, C.; MÜLLER, R. H. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. **International Journal of Pharmaceuticals**, v.414, p.276-284, 2011.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaífera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatol Ther**, v.20, p.360-376, 2007.

PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.161, p.269-274, 2004.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, n.2, p.106-110, 2005.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Química Nova**, v.25, n.2, p.246-253, 2002.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLES, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.288, p.144-150, 2006.

PISSAVINI, M.; FERRERO, L.; ALARD, V.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; KOCKOTT, D.; LUTZ, D.; TOURNIER, V.; ZAMBONIN, M.; MELONI, M. Determination of the *in vitro* SPF, **Cosmetics & Toiletries Magazine**, v.118, n.10, p.63-72, 2003.

SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. **Langmuir**, v.22, p.5597-5603, 2006.

SAMBANDAN, B. A. D. R.; RATNER, M. D. D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.64, n.4, p.748-758, 2011.

SAYRE, R. M.; STANFIELD, J.; BUSH, A. J.; LOTT, D. L. Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.17, n.6, p.278-232, 2008.

SCHAEFER, H.; MOYAL, D.; FOURTANIER, A. Recent advances in sun protection. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v.17, p.266-75, 1998.

SHAATH, N. A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N. J.; SHAATH, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.3-33.

SHINODA, K.; SAITO, H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane and nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.26, p.70-74, 1968.

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

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.145-149, 2004.

SPRINGSTEEN, A; YUREK, R; FRAZIER, M. CARR, K.F. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analitica Chimica Acta**, v.380, p.155-164, 1999.

SUMMERS, B.; SUMMERS, R.S.; MULLER, E. A national web-based survey of sunscreen products as a tool for industry self-regulation, consumer awareness campaigns and marketing. **International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Magazine**, v.8, n.3, p.201-204, 2005.

SUN, Y-P.; LI, X.; CAO, J.; ZHANG, W.; WANG, H. P. Characterization of zero-valent iron nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.120, p.47-56, 2006.

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

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J. Formation and Stability of Nano-Emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.303-318, 2004.

THE ROYAL SOCIETY AND ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties**. Plymouth, UK: Latimer Trend Ltd, 2004. 116 p. Disponível em: <<http://www.nanotec.org.uk/finalreport.htm>>. Acesso em: 09 mai. 2010.

USÓN, N.; GARCIA, M. J.; SOLANS, C. Formation of water-in-oil (w/o) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil system prepared by a low-energy emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.250, p.415-421, 2004.

VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; HAROUTIOUNIAN, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, p.50-57, 2008.

VIDAL, L.; CHISVERT, A.; CANALS, A.; SALVADOR, A. Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1174, p.95-103, 2007.

ZENITECH. **Emulsion Optimization by Use of Phase Inversion Temperature (PIT)**. Old Greenwich, CT, 2010. Disponível em: <<http://www.zenitech.com>>. Acesso em: 09 set. 2010.

**Referências de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023*

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumo do manuscrito submetido para periódico científico**Influence of particle size on appearance and *in vitro* efficacy of sunscreens**

Nanotechnology applies to diverse sectors of science. In cosmetic area, investments have strengthened the idea that nanoproducts provide innumerable benefits to consumers. Extreme exposition to solar light can cause undesirable effects, thus, adding UV filters in cosmetic products are often used as prevention. Ethylhexyl methoxycinnamate and benzophenone-3 are UV filters widely used in sunscreen formulations, this UV filters absorb UVB and UVA radiation, respectively. In this study, sunscreen formulations were developed as nano and macroemulsion, but composed by the same raw material. Nanoemulsion was obtained by phase inversion temperature method (PIT). Physical and functional properties were evaluated by visual analysis, particle size distribution and by diffuse reflectance spectrophotometry. Achieved nanoemulsion showed bluish brightness aspect, less apparent consistency than macroemulsion, stability longer than 48 hours ($22.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$) and bimodal particle size distribution with average (mean) sizes around 10 nm (61%) and 4.5 μm (39%). Macroemulsion showed milky aspect, higher consistency than nanoemulsion, instability after 48 hours ($22.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$) and bimodal particle size distribution with average (mean) size around 202 nm (9%) and 10.4 μm (91%). Effectiveness profile of sunscreen formulations remained apparently similar, based on achieved results of *in vitro* SPF, UVA/UVB ratio and critical wavelength assays.

Uniterms: Nanoemulsion. PIT method. Benzophenone-3. Ethylhexyl methoxycinnamate.

ANEXOS

ANEXO A – Dados referentes a análise estatística da influência das variáveis na PIT

Factorial Fit: PIT versus Agitação, NaCl, Glicerina

Estimated Effects and Coefficients for PIT (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	p
Constant		64.037	0.3516	182.15	p < 0.001
Agitação	-1.889	-0.944	0.4306	-2.19	0.041
NaCl	-7.000	-3.500	0.4306	-8.13	p < 0.001
Glicerina	-4.667	-2.333	0.4306	-5.42	p < 0.001
Agitação*NaCl	1.167	0.583	0.5274	1.11	0.282
Agitação*Glicerina	0.333	0.167	0.5274	0.32	0.755
NaCl*Glicerina	-2.167	-1.083	0.5274	-2.05	0.054
Agitação*NaCl*Glicerina	-1.500	-0.750	0.6459	-1.16	0.260

S = 1.82681 PRESS = 152.062 R-Sq = 84.94%

R-Sq(pred) = 63.88% R-Sq(adj) = 79.39%

Analysis of Variance for PIT (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Main Effects	3	334.556	334.556	111.519	33.42	p < 0.001
2-Way Interactions	3	18.500	18.500	6.167	1.85	0.173
3-Way Interactions	1	4.500	4.500	4.500	1.35	0.260
Residual Error	19	63.407	63.407	3.337		
Total	26	420.963				

Unusual Observations for PIT

Obs	StdOrder	PIT	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
21	21	56.0000	60.5370	0.5559	-4.5370	-2.61R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Coefficients for PIT using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	87.7037
Agitação	-0.0272222
NaCl	-7.58333
Glicerina	-1.03333
Agitação*NaCl	0.0104167
Agitação*Glicerina	0.00166667
NaCl*Glicerina	0.233333
Agitação*NaCl*Glicerina	-7.50000E-04

ANEXO B – Dados da análise estatística para influência no tamanho de partícula

Factorial Fit: Size1 versus Agitação, NaCl, Glicerina

Estimated Effects and Coefficients for Size1 (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	p
Constant		0.13837	0.04586	3.02	0.007
Agitação	0.12733	0.06367	0.05617	1.13	0.271
NaCl	-0.11378	-0.05689	0.05617	-1.01	0.324
Glicerina	0.11356	0.05678	0.05617	1.01	0.325
Agitação*NaCl	0.12217	0.06108	0.06879	0.89	0.386
Agitação*Glicerina	0.10467	0.05233	0.06879	0.76	0.456
NaCl*Glicerina	0.02867	0.01433	0.06879	0.21	0.837
Agitação*NaCl*Glicerina	0.09350	0.04675	0.08425	0.55	0.585

S = 0.238300 PRESS = 2.23693 R-Sq = 21.00%

R-Sq(pred) = 0.00% R-Sq(adj) = 0.00%

Analysis of Variance for Size1 (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Main Effects	3	0.18924	0.18924	0.06308	1.11	0.369
2-Way Interactions	3	0.08010	0.08010	0.02670	0.47	0.707
3-Way Interactions	1	0.01748	0.01748	0.01748	0.31	0.585
Residual Error	19	1.07895	1.07895	0.05679		
Total	26	1.36578				

Unusual Observations for Size1

Obs	StdOrder	Size1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
23	23	0.768000	0.152815	0.114652	0.615185	2.94R
26	26	0.774000	0.237704	0.114652	0.536296	2.57R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Coefficients for Size1 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	0.12443
Agitação	0.00011917
NaCl	0.011694
Glicerina	0.030322
Agitação*NaCl	-1.62083E-04
Agitação*Glicerina	-4.11667E-05
NaCl*Glicerina	-0.0251833
Agitação*NaCl*Glicerina	4.67500E-05

ANEXO C – Dados da análise estatística para influência no FPS

Factorial Fit: FPS versus Agitação, NaCl, Glicerina

Estimated Effects and Coefficients for FPS (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	p
Constant		9.852	0.5735	17.18	p < 0.001
Agitação	-0.111	-0.056	0.7023	-0.08	0.938
NaCl	0.556	0.278	0.7023	0.40	0.697
Glicerina	1.778	0.889	0.7023	1.27	0.221
Agitação*NaCl	-2.167	-1.083	0.8602	-1.26	0.223
Agitação*Glicerina	-0.500	-0.250	0.8602	-0.29	0.774
NaCl*Glicerina	2.167	1.083	0.8602	1.26	0.223
Agitação*NaCl*Glicerina	2.250	1.125	1.0535	1.07	0.299

S = 2.97975 PRESS = 408.459 R-Sq = 24.49%

R-Sq(pred) = 0.00% R-Sq(adj) = 0.00%

Analysis of Variance for FPS (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Main Effects	3	15.67	15.67	5.222	0.59	0.630
2-Way Interactions	3	28.92	28.92	9.639	1.09	0.379
3-Way Interactions	1	10.13	10.13	10.125	1.14	0.299
Residual Error	19	168.70	168.70	8.879		
Total	26	223.41				

Unusual Observations for FPS

Obs	StdOrder	FPS	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
27	27	19.0000	12.1019	1.4336	6.8981	2.64R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Coefficients for FPS using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-9.4815
Agitação	0.0355556
NaCl	8.11111
Glicerina	1.24444
Agitação*NaCl	-0.0166667
Agitação*Glicerina	-0.00250000
NaCl*Glicerina	-0.458333
Agitação*NaCl*Glicerina	0.00112500