

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**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**

*Gabriela Garrastazu Pereira*

*Ribeirão Preto  
2008*

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**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**

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

**Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.**

**Orientada: Gabriela Garrastazu Pereira  
Orientador: Prof. Dr. Pedro A. Rocha Filho**

*Ribeirão Preto*  
**2008**

“AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES  
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU  
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE  
CITADA A FONTE - O AUTOR”

## FICHA CATALOGRÁFICA

PEREIRA, Gabriela Garrastazu

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, Ribeirão Preto, 2008.

118 p. : il. ; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto, USP

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: ROCHA-FILHO, Pedro Alves

1. nanoemulsão. 2. óleo de semente de uva. 3. óleo de oliva. 4.  
metoxicinamato de octila. 5. potencial antioxidante. 6. atividade fotoprotetora.

## Folha de Aprovação

Gabriela Garrastazu Pereira

Obtenção de nanoemulsões O/A á base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.  
Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Laboratório de Tecnologia de Cosméticos.

**Apoio Financeiro**

**Capes**

"Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não encontra graça em si mesmo. Morre lentamente quem destrói o seu amor-próprio, quem não se deixa ajudar, morre lentamente quem se transforma em escravo do hábito, repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece. Morre lentamente quem evita uma paixão e seus redemoinhos de emoções, justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos, corações aos tropeços. Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite pelo menos uma vez na vida a fugir dos conselhos sensatos. Morre lentamente, quem abandona um projeto antes de iniciá-lo, não pergunta sobre um assunto que desconhece ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe..." Viva hoje! Arrisque hoje! Faça hoje! Não deixe morrer lentamente

Pablo Neruda

"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida; duvidando começamos a questionar, e procurando podemos achar a verdade"  
(Pierre Abelard)

Aprendi que, quanto mais corremos atrás de nossos sonhos, mais sentimos vontade de conseguir conciliar a aprendizagem, o sucesso e a essência da vida com aqueles que amamos.

Dedico este trabalho, em especial, aos meus pais Ana Lúcia e Marcus, a minha irmã Mariana, minha avó Teresinha e a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para que este sonho se tornasse realidade.

Obrigado pelo carinho, amor e dedicação!

"Durante a nossa vida  
Passamos por muitos lugares  
Vivemos momentos que não mais voltarão  
E que deixaram na memória apenas as lembranças...  
Encontramos pessoas as quais não lembraremos  
E outras que jamais esqueceremos.  
Talvez pelo seu simples olhar,  
seu falar, seu sorriso...  
Ou talvez pelo fato de terem cruzado o nosso caminho.  
Outras por terem nos magoado, por nos fazerem sofrer...  
Mas são as pessoas especiais para nós  
Que nos fazem sentir aquela saudade...  
Saudade das conversas, das brincadeiras, dos sorrisos,  
Das lágrimas derramadas, do não falar...  
Quero que saibam que entre as pessoas especiais que fazem parte da minha vida  
Vocês são algumas delas."

Agradecimento especial:

Aos amigos e colegas de laboratório *Bianca, Cíntia, Fer Frota, Giselly, Jackie, Land, Maria Fer, Mateus e Mônica* vocês continuam sendo as mãos mais amigas que o destino me enviou... Quando faltou idéia vocês pensaram, quando faltou material vocês trabalharam, quando faltou estímulo vocês me estenderam a mão e principalmente quando não tinha conhecimento suficiente vocês compartilharam. Sem vocês a realização dessa dissertação teria sido bem mais difícil.



## Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à *Deus*, por me conceder a vida com muita saúde, e de realizar mais uma etapa da minha vida. E ao meu anjo da guarda, meu avô *Álvaro*, que com certeza esteve sempre presente nesta jornada, me cuidando, a qual muitas vezes não foi fácil!

Ao meu orientador Prof. Dr. *Pedro Alves da Rocha-Filho* pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a orientação, a confiança, o respeito e a amizade. Sou muito grata por tudo.

Aos meus pais *Ana Lúcia e Marcus*, à minha irmã *Mariana*, as minhas avós *Glecy e Teresinha*, ao *Dindo e a Dinda* e as minhas primas *Cláudia, Cibeli, Juliana e Maria*, pela participação em mais esta conquista, pela compreensão mais um vez das horas dedicadas ao mestrado e que faltaram no nosso convívio familiar, pelas inúmeras horas ao telefone as quais amenizávamos a saudade e diminuíamos a distância, pelo apoio, incentivo e principalmente pelo amor!

À *Família Webber e Pozzan, Tia Ana, Tio Gilberto, Bruna, Cacá, Felipe e Júlia*, minha família ribeirão pretana, por terem me acolhido, me tratado como parte da família de vocês, me permitindo partilhar muitos momentos agradáveis e inesquecíveis. Que dividiram comigo as saudades de casa, as dificuldades do dia a dia e me ensinaram que família vai muito além de laços de sangue. "*Nenhum caminho é longo demais quando se tem amigos ao lado.*"

À *Fer Frota*, por toda amizade e companheirismo. Amiga sempre presente, companheira pra qualquer situação. Você sempre será um exemplo de amizade e alegria. Agradeço a Deus por ter a honra de ter uma amiga como você. "*Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só.*" (*Amir Klink*)

À *Jú, ao Rafa e a Alice* por me permitirem partilhar um pouco mais da vida de vocês, pessoas maravilhosas, que me acolheram com tanto carinho, amor e uma gostosa amizade. "*O encanto da vida, depende unicamente das amizades que cultivamos*" (*Malba Tahan*)

Aos meus amigos e colegas por todos os momentos compartilhados durante este longo período: *Adriane, Ana Paula, Érika, Fábria, Gil, Kauê, Marina, Marisa, Maira, Natália, Raquel e Vívian*. “*Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações, pois boas lembranças, são marcantes.*” (Vinícius de Moraes)

Às minhas mais que amigas e quase irmãs gaúchas *Ana Petry, Carolzinha, Fernanda, Flávia, Mauren, Marina e Sílvia* que nunca duvidaram do meu potencial, muitas vezes acreditando em mim em momentos em que eu mesma duvidava. “*Depois de algum tempo vocês aprende que as verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.*” (William Shakespeare)

À Profa. Dra. *Têmis Webber Furlanetto Côrte* que foi a primeira professora a me ensinar a arte da cosmetologia e por partilhar seus conhecimentos durante a faculdade.

À Profa. Dra. *Maria José Fonseca* pela disponibilização o laboratório para a realização dos ensaios antioxidante e fotoprotetor *in vitro*, e principalmente à *Paulinha*, que disponibilizou seu tempo para me ajudar na realização dos experimentos.

À Profa. Dra. *Renata Fonseca Vianna Lopez* pela disponibilização dos equipamentos para a realização dos ensaios de retenção e permeação cutânea *in vitro*, pelas valiosas contribuições na discussão dos resultados e principalmente ao *Guilherme*, que disponibilizou seu tempo, sua ajuda e seus conhecimentos para a realização deste teste.

Aos funcionários e amigos da FCFRP pelo suporte e apoio. Em especial aos funcionários *Ana, Clóvis, Eduardo Bortolin, Eleni, José Maria, Jabour, Rosana, Seu Antônio e Toninho* pela assistência, pela pronta ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às empresas *Aboissa, Croda do Brasil, Beracca, Oxiteno e Pharmspecial* por gentilmente cederem matérias primas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo* pela oportunidade de fazer parte de um centro de excelência e referência.

*À Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de mestrado, viabilizando minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.*

***Meus sinceros agradecimentos!***

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	v
<b>Lista de Figuras</b> .....	vi
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	vii
<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2-REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1- Pele .....	6
2.1.1- Epiderme .....	7
2.1.2- Derme.....	8
2.1.3- Hipoderme .....	10
2.2- Radiação ultravioleta (UV).....	10
2.2.1- Efeitos da radiação UV sobre a pele – fotoenvelhecimento.....	12
2.3- Sistemas naturais de proteção à radiação UV.....	15
2.4- Protetor solar.....	16
2.4.1- Filtros químicos.....	18
2.4.2- Filtros físicos.....	19
2.4.3- Filtros solares químicos de origem natural.....	20
2.4.4- Fator de proteção solar (FPS).....	21
2.5- Radicais livres e os antioxidantes.....	22
2.6- Óleo de oliva.....	25
2.6.1- Polifenóis.....	27
2.7- Óleo de semente de uva.....	28
2.7.1-Tocoferóis e Tocotrienóis.....	29
2.8- Emulsões.....	30
2.9- Nanotecnologia em cosméticos.....	31
2.10-Nanoemulsões.....	33
2.10.1- Vantagens das nanoemulsões para a aplicação cosmética.....	34
2.10.2- Métodos de obtenção das nanoemulsões.....	35
2.10.2.1- Métodos que utilizam alta energia de emulsificação.....	35
2.10.2.2- Métodos que utilizam baixa energia de emulsificação.....	37
<b>3-OBJETIVOS</b> .....	39
<b>4-MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1- Material .....	42
4.1.1- Fase oleosa .....	42
4.1.2- Fase aquosa .....	43
4.1.3- Tensoativos.....	43
4.1.4- Ativo.....	44
4.1.5- Conservante.....	44
4.1.6- Teste de FPS <i>in vitro</i> .....	45
4.1.7- Ensaio HET-CAM.....	45
4.1.8- Permeação Cutânea <i>in vitro</i> .....	45
4.2- Métodos .....	46
4.2.1- <i>Screening</i> dos óleos através da redução do radical DPPH•.....	46
4.2.2- Preparo das emulsões.....	47
4.2.2.1- Emulsificação por aquecimento das fases.....	47
4.2.2.2- Determinação do EHL requerido para os óleos de oliva e semente de uva.....	47
4.2.2.3- Determinação do sistema tensoativo.....	48
4.2.2.4- Obtenção de nanoemulsões.....	49
4.2.2.5- Preparo das nanoemulsões.....	51
4.2.2.6- Adição do metoxicinamato de octila às nanoemulsões.....	52
4.2.3- Teste de estabilidade das nanoemulsões.....	52
4.2.3.1- Teste Preliminar de Estabilidade.....	52

4.2.3.1.1-Estresse Térmico.....	52
4.2.3.1.2-Centrifugação.....	53
4.2.3.2- Teste de Estabilidade Acelerada (TEA) .....	53
4.2.3.2.1- Distribuição granulométrica.....	53
4.2.3.2.2- Determinação do valor de pH.....	54
4.2.4-Análise das variáveis do processo de obtenção dos sistemas nanoemulsionados propostos.....	54
4.2.4.1- Influência da temperatura.....	54
4.2.4.1.1-Emulsificação à frio.....	54
4.2.4.1.2- Emulsificação com aquecimento de fases.....	55
4.2.4.2- Influência da ordem de adição dos componentes.....	55
4.2.4.3-Influência da velocidade de agitação.....	55
4.2.5- Determinação do ponto de inversão de fases através da medida da condutividade em função da temperatura (inversion point).....	56
4.2.6- Determinação <i>in vitro</i> do fator de proteção solar (FPS).....	56
4.2.7- Determinação da atividade antioxidante das emulsões.....	58
4.2.8- Estudo preliminar <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea do metoxicinamato de octila.....	58
4.2.8.1- Preparação da macroemulsão –controle.....	58
4.2.8.2-Obtenção da pele.....	58
4.2.8.3-Estudo <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea.....	59
4.2.9- Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET-CAM.....	61
4.2.9.1- Preparação da membrana corioalantóide.....	61
4.2.9.2-Aplicação da amostra.....	62
4.2.9.3- Controles positivos.....	62
4.2.9.4-Observação da membrana.....	62
4.2.9.5- Avaliação das lesões.....	63
4.2.10-Análise estatística.....	64
<b>5-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
5.1- Estudo da fase oleosa.....	66
5.1.1- <i>Screening</i> dos óleos através da redução do radical DPPH* .....	66
5.2-Preparo das emulsões.....	69
5.2.1- Determinação do EHL requerido para os óleos de oliva e semente de uva.....	69
5.2.2- Determinação do sistema tensoativo.....	70
5.2.3- Obtenção de nanoemulsões.....	72
5.2.4-Preparo das nanoemulsões.....	73
5.2.5- Adição do metoxicinamato de octila às nanoemulsões.....	73
5.3-Teste de estabilidade das nanoemulsões.....	74
5.3.1- Teste preliminar de estabilidade.....	74
5.3.2-Teste de Estabilidade Acelerada.....	76
5.4- Análise das variáveis do processo de obtenção dos sistemas nanoemulsionados propostos.....	80
5.4.1- Influência da temperatura.....	81
5.4.1.1-Emulsificação à frio.....	82
5.4.1.2- Emulsificação com aquecimento de fases.....	83
5.4.2- Influência da ordem de adição dos componentes.....	85
5.4.3-Influência da velocidade de agitação.....	87
5.5- Determinação do ponto de inversão de fases através da medida da condutividade em função da temperatura.....	88
5.6- Determinação <i>in vitro</i> do fator de proteção solar (FPS).....	90
5.7-Determinação da atividade antioxidante das nanoemulsões.....	91
5.8- Estudo preliminar de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	94
5.9- Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET-CAM.....	97
<b>6- CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>

*Resumo*

## RESUMO

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. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A nanotecnologia é um fenômeno que se aplica a praticamente todos os setores da ciência, sendo que na área cosmética o elevado investimento neste campo tem reforçado a idéia de que os produtos nanotecnológicos proporcionam vantagens reais aos consumidores. 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, por exemplo, nanoemulsões, que além da inerente estabilidade, apresentam aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação. Existem dois métodos de obtenção das nanoemulsões: empregando baixa ou alta energia de emulsificação. O uso de óleos vegetais em produtos cosméticos tem sido intensamente valorizado, baseando-se no conceito de que são seguros e biocompatíveis. Podem ser utilizados em cosméticos com sua funcionalidade potencializada, sendo estes ricos em ácidos graxos essenciais, Ômega 3, Ômega 6, Ômega 9, fitosteróis, vitamina C e polifenóis (antocianinas). Alguns óleos vegetais têm poder antioxidante comprovado, previnem as oxidações biológicas e reduzem a formação de radicais livres responsáveis pelo dano celular, grande vilão do envelhecimento e das doenças crônico-degenerativas, como o câncer. Atualmente é crescente o interesse da pesquisa sobre a atividade de substâncias capazes de proteger a pele contra a radiação ultravioleta de forma eficaz. O metoxicinamato de octila é um filtro solar químico capaz de proteger a pele e conferir um fator de proteção solar ao produto final. Nesse estudo foram desenvolvidas nanoemulsões à base de óleos de oliva e semente de uva aditivadas de metoxicinamato de octila. Após a análise da estabilidade físico-química e caracterização das formulações, foram avaliados o potencial antioxidante das formulações, o efeito de proteção solar do sistema, liberação e permeação do ativo e uma possível irritação ocular das formulações que se mantiveram estáveis.

**Palavras- chaves:** Nanoemulsão, óleo de oliva, óleo de semente de uva, metoxicinamato de octila, potencial antioxidante, ação fotoprotetora.

*Abstract*



## ABSTRACT

PEREIRA, G. G., **Attainment of O/W nano-emulsion with grape seed oil and olive oil added of octylmethoxycinnamate and study of the antioxidant potential and the sun protection of the emulsions**, 2008. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Nanotechnology is a phenomenon that is applied to mainly all sectors of science. In the cosmetic area the high investment has strengthened the idea that nanotechnology products offer real advantages to consumers. The growing demand of consumers and the advances in the knowledge about production and stability of dispersed systems enable the development of differentiated vehicles such as nano-emulsions, which besides their inherent stability, they have pleasant sensorial aspect, high spread ability and hydration power. There are two methods of nano-emulsions attainment: low or high energy of emulsifying. The use of vegetable oils in cosmetic products has had enormous and growing value, based in the concept that they are safe and biocompatible. They can be used in cosmetics with their functionality improved, being rich in essential fatty acids, Omega 3, Omega 6, Omega 9, phytosterols, vitamin C and polyphenols (anthocyanins). Some vegetable oils have proved antioxidant power, as well as they avoid biological oxidation and decrease the forming of free radicals responsible for cellular damage, which are the causes of aging and disease such as cancer. Nowadays, the interest of research about the activity of substances that protect the skin against ultraviolet irradiation in an efficacious way is growing. Octylmethoxycinnamate is a chemical sunscreen that can protect skin and offers sun protection factor to final product. In this study nano-emulsions were developed using olive oil and grape seed oil added with octylmethoxycinnamate. After the analysis of the physic-chemical stability and formulation characterization, the antioxidant potential of formulations, the effect of sun protection of the system, delivery and permeation of the active agent, and a possible ocular irritation of the stable formulations were evaluated.

**Key-words: Nano-emulsion, olive oil, grape seed oil, octylmethoxycinnamate, antioxidant potential, sun protection action.**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alterações cutâneas induzidas pelo sol.....	14
<b>Tabela 2:</b> Nomenclatura dos filtros solares segundo a ANVISA e ao INCI (nomenclatura pelo INCI, fonte itálico).....	16
<b>Tabela 3:</b> Especificações do óleo de oliva conforme o fornecedor (Aboissa).....	42
<b>Tabela 4:</b> Especificações do óleo de semente de uva conforme o fornecedor (Lipo do Brasil).....	42
<b>Tabela 5:</b> Especificações do óleo de açaí conforme o fornecedor (Beraca Sabará).....	42
<b>Tabela 6:</b> Especificações do metoxicinamato de octila conforme o fornecedor (Pharmaspecial).....	44
<b>Tabela 7:</b> Concentração em % (p/p) de tensoativos lipofílico e hidrofílico utilizados na obtenção do EHL (Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo) requerido para os óleos de oliva e semente de uva.....	48
<b>Tabela 8:</b> Denominação e composição % (p/p) das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.....	49
<b>Tabela 9:</b> Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário.....	50
<b>Tabela 10:</b> Constantes EE e I pré- definidas por MANSUR para o cálculo de FPS <i>in vitro</i> .....	57
<b>Tabela 11:</b> Composição % (p/p) da macroemulsão utilizada para o teste preliminar de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	58
<b>Tabela 12:</b> Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo.....	63
<b>Tabela 13:</b> Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos.....	63
<b>Tabela 14:</b> Análise macroscópica e microscópica das formulações com os óleos de oliva, semente de uva e a mistura dos dois.....	71
<b>Tabela 15:</b> Formulações usadas no desenvolvimento da pesquisa, % (p/p).....	74
<b>Tabela 16:</b> Resultado do teste de estabilidade preliminar, análise macroscópica, estresse térmico e centrifugação.....	76
<b>Tabela 17:</b> Determinação do tamanho de glóbulo (nm) e desvio padrão das nanoemulsões, durante o teste de estabilidade acelerada, por um período de 30 dias (n=3).....	77
<b>Tabela 18:</b> Determinação dos valores de pH e desvio padrão das nanoemulsões durante o teste de estabilidade acelerada num período de 30 dias (n=3).....	80
<b>Tabela 19:</b> Características macro e microscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação.....	84
<b>Tabela 20:</b> Média do tamanho (nm) e desvio padrão dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação (n=3).....	85
<b>Tabela 21:</b> Tamanho dos glóbulos (nm) e desvio padrão das formulações preparadas pelo método A (n=3). .....	86
<b>Tabela 22:</b> Análise e desvio padrão do FPS das nanoemulsões Oliva B, Suva B, Soliva B e do padrão comercial segundo teste descrito por MANSUR (1984) (n=3).....	90
<b>Tabela 23:</b> Cálculo da IC <sub>50</sub> para a atividade redutora do radical DPPH• das emulsões.....	94
<b>Tabela 24:</b> Quantidade de ativo na pele após 12 h (µg/cm <sup>2</sup> ) (n=3).....	95
<b>Tabela 25:</b> Classificação, pontuação e desvio padrão dos produtos após o teste de irritação em modelo organotípico – HET- CAM (n = 3).....	98

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura da pele ( <a href="http://www.afh.bio.br">www.afh.bio.br</a> ).....	6
<b>Figura 2:</b> Espectro da radiação eletromagnética. Em destaque radiação não-ionizante ( <a href="http://www.uvlife.com.br/o_que_e_uvc_html,sergiomatiashvialonga.blogspot.com/2008/05/esp...">www.uvlife.com.br/o_que_e_uvc_html,sergiomatiashvialonga.blogspot.com/2008/05/esp...</a> )	11
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da penetração de diferentes radiações na pele (LAWRENCE, 2001).....	13
<b>Figura 4:</b> Estrutura da Epiderme (LÉPORI, 2002).....	15
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do processo de absorção da radiação UV pelos filtros químicos (SHAATH, 1986).....	18
<b>Figura 6:</b> Geração de EROs a partir da redução do oxigênio molecular na reação de fosforilação oxidativa (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).....	23
<b>Figura 7:</b> Formação de radicais livres e mecanismos antioxidantes biológicos ( <a href="http://www.smokersrx.com/why_skin_ages.html">www.smokersrx.com/why_skin_ages.html</a> ).....	24
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo/ água (O/A) e água / óleo (A/O) (OLIVEIRA, 2008).....	31
<b>Figura 9:</b> Escala de granulometria das emulsões (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 1999).....	34
<b>Figura 10:</b> Estrutura molecular do Polissorbato 80 ( <a href="http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P8074">www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P8074</a> ).....	43
<b>Figura 11:</b> Estrutura molecular de monoelato de sorbitano ( <a href="http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/S6760">www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/S6760</a> ).....	43
<b>Figura 12:</b> Estrutura molecular do óxido de etileno, para o Ultroil R150 <sup>®</sup> e Ultroil R300 <sup>®</sup> (MEYER, WAIDELICH & FRAHM, 2002; CROY & KWON, 2005).....	44
<b>Figura 13:</b> Estrutura molecular do óleo de rícino (MEYER, WAIDELICH & FRAHM, 2002; CROY & KWON, 2005).....	44
<b>Figura 14:</b> Estrutura molecular do Metoxicinamato de octila ( <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Octyl_methoxycinnamate">en.wikipedia.org/wiki/Octyl_methoxycinnamate</a> ).....	44
<b>Figura 15:</b> Representação do diagrama ternário (ZANATTA, 2008).....	50
<b>Figura 16:</b> Esquema da espectroscopia de correlação de fóton ou espalhamento quase-elástico de luz, conforme aparelho Coulter DELSA 440XS, para caracterização do tamanho de glóbulo.....	54
<b>Figura 17:</b> Célula de difusão tipo “Franz” (LOPEZ <i>et al.</i> , 2001, LOPEZ <i>et al.</i> , 2004).....	59
<b>Figura 18:</b> Preparação da membrana, primeiro se recorta a casca do ovo (a) e se elimina uma primeira membrana esbranquiçada (b) para expor a CAM. A seguir foram aplicados os produtos (c) e se avaliam os fenômenos de forma visual (d) (Imagens obtidas de <a href="http://www.schrader-institute.de/html/creachem_tox_ver.htm">http://www.schrader-institute.de/html/creachem_tox_ver.htm</a> ).....	62
<b>Figura 19:</b> Gráfico da atividade redutora do radical DPPH•, para screening de óleos vegetais.....	66
<b>Figura 20:</b> Diagrama ternário, com as formulações manipuladas para a escolha da formulação. Emulsões 27, 28, 35 e 36: mais estáveis; emulsões 2, 5, 9, 14 e 20: separação total de fases; e as emulsões 10, 15 e 21: levemente cremeadas.....	73
<b>Figura 21:</b> Influência da velocidade de agitação no tamanho de glóbulo das nanoemulsões Oliva A, Suva A e Soliva A.....	87
<b>Figura 22:</b> Gráfico da determinação do PIT, através da medida da condutividade elétrica (mV) em função da temperatura (°C) das nanoemulsões Oliva A, Suva A e Soliva A.....	89
<b>Figura 23:</b> Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para as emulsões com óleo de Oliva A (óleo de oliva 10%, sistema tensoativo 10% e água 80%).....	92
<b>Figura 24:</b> Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para a emulsão Suva A (óleo de semente de uva 10%, sistema tensoativo 10% e água 80%).....	93
<b>Figura 25:</b> Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para a emulsão Soliva A (óleo de oliva 2,5%, óleo de semente de uva 7,5%, sistema tensoativo 10% e água 80%).....	93
<b>Figura 26:</b> Gráfico da quantidade de ativo (ug/cm <sup>2</sup> ) nas camadas da pele após 12hs de permeação.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5- ALA</b>	Ácido 5- aminolevulínico
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CCFS</b>	Carga de filtro solar
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DPPH•</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>EC</b>	Etrato córneo
<b>EHL</b>	Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo
<b>EIF</b>	Emulsificação por Inversão de Fases
<b>EPI</b>	Emulsion Phase Inversion
<b>EROS</b>	Espécies reativas de Oxigênio
<b>FPS</b>	Fator de proteção solar
<b>G</b>	Gravidade
<b>HET-CAM</b>	Hen's Egg test chorioallantoic membrane (Ensaio da membrana córioalantóide do ovo de galinha)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória 50%
<b>IP</b>	Índice de polidispersividade
<b>LM</b>	Levemente modificado
<b>M</b>	Modificado
<b>N</b>	Normal
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NBT</b>	Azul de nitro tetrazólio
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>Oliva A</b>	Emulsão de óleo de oliva
<b>Oliva B</b>	Emulsão de óleo de oliva com metoxicinamato de octila
<b>OMC</b>	Metoxicinamato de octila
<b>p/p</b>	peso/peso
<b>p/v</b>	peso/ volume
<b>PA</b>	Padrão absoluto
<b>PIT</b>	Phase Inversion Temperature
<b>RUV</b>	Raios ultravioleta
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>Soliva A</b>	Emulsão de óleo de oliva e semente de uva
<b>Soliva B</b>	Emulsão de óleo de oliva e semente de uva com metoxicinamato de octila
<b>Suva A</b>	Emulsão de óleo de semente de uva
<b>Suva B</b>	Emulsão de óleo de semente de uva com metoxicinamato de octila
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de titânio
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta A
<b>UVB</b>	UltravioletaB
<b>UVC</b>	Ultravioleta C
<b>ZnO</b>	Oxido de zinco

## *1- INTRODUÇÃO*

---

## **1 – INTRODUÇÃO**

Emulsões são amplamente empregadas como veículos pela indústria cosmética e farmacêutica. Estes sistemas permitem o transporte de ativos e/ou fármacos lipofílicos e hidrofílicos em uma mesma formulação e, dependendo de suas características microestruturais, possibilitam um perfil sustentado de liberação do ativo e/ou fármaco encapsulado. A possibilidade em controlar aspectos sensoriais e organolépticos permite adequá-las às necessidades e às exigências da via de administração pretendida para tal emulsão, o que é extremamente importante para o formulador cosmético e/ou farmacêutico que deseje produzir veículos eficazes, eficientes e que, concomitantemente, sejam aprovados pelo consumidor e/ou paciente.

As nanoemulsões mostram-se promissoras em várias áreas da ciência cosmética e farmacêutica. Apresentam vantagens desejáveis à aplicação cosmética, como considerável estabilidade físico-química e sensorial agradável. O tamanho reduzido dos glóbulos em dispersão pode apresentar maior facilidade em alcançar o substrato desejado para ação cosmética: o estrato córneo e a epiderme. No entanto, para viabilizar sua utilização como veículo, é necessário que fatores envolvidos no processo de obtenção e na estabilidade do sistema disperso sejam criteriosamente estudados.

É fundamental que cosméticos sejam desenvolvidos e seu uso viabilizado. Porém, para que estes possam ser comercializados e constantemente aprimorados, parâmetros como mecanismos de obtenção, estabilidade e perfil de liberação dos ativos devem ser elucidados. Isto exige da ciência cosmética, não só a descoberta de novos ativos, como também o aprimoramento das técnicas de preparo, da farmacotécnica dos sistemas emulsionados que veiculam esses ativos.

A expectativa de vida da população humana tem aumentado e o efeito do envelhecimento seja por fatores internos ou externos tem sido uma preocupação constante.

Em termos de prevenção e tratamento, visando a manutenção da qualidade de vida no decorrer dos anos. A exposição intensa ao sol tem efeitos maléficos à saúde da pele. No Brasil, a exposição à luz UV, devido à geografia e o clima dos trópicos é bastante significativa. Apesar de grande parte da população brasileira ter uma proteção natural maior devido à presença de melanina, casos de câncer de pele ocorrem com mais frequência.

Assim, é de grande importância o estudo de formulações contendo substâncias ativas com ação contra os raios solares, seja por proteção direta (filtros solares) ou indireta, através de substâncias que combatem os radicais livres, impedindo danos celulares severos e melhorando as condições gerais da pele.

Nos últimos anos, o uso de produtos, especialmente antioxidantes naturais, presentes na alimentação e em bebidas comuns ingeridas pela população, tem apresentado considerável atenção como agentes contra os danos solares. Muitos destes também encontram aplicação nos produtos de cuidados para a pele.

Alguns óleos vegetais têm potencial antioxidante comprovado, sendo assim, previnem as reações de oxidação biológica e reduzem a formação de radicais livres responsáveis pelo dano celular e grandes vilões do envelhecimento e das doenças crônico-degenerativas, como o câncer.

Os óleos vegetais que possuem ação antioxidante, como os óleos de oliva, semente de uva, buriti, urucum, sendo ricos em ácidos graxos essenciais, Ômega 3, Ômega 6, Ômega 9, fitosteróis, vitamina C e polifenóis (antocianinas) que podem ser utilizados em cosméticos com sua funcionalidade potencializada.

O emprego de óleos e de agentes tensoativos derivados ou de origem natural garantem ao formulador o desenvolvimento de produtos seguros e compatíveis com a pele, e ao consumidor, o uso de produtos derivados de produtos naturais, o que sem dúvida, é um interessante apelo mercadológico.

Uma tendência mundial tem sido observada pela busca crescente por produtos naturais e antioxidantes, como o uso de produtos cosméticos de origem vegetal que possuam propriedades importantes para a preservação da saúde.

Desta forma, esta pesquisa teve o propósito de desenvolver nanoemulsões O/A contendo óleo vegetal e filtro solar, elucidando as variáveis relevantes à formulação e ao processo de emulsificação, caracterizar os aspectos físico-químicos das nanoemulsões obtidas e realizar testes de fotoproteção e atividade antioxidante. Além disso, foi avaliada também a utilização dos óleos de oliva e semente de uva com agentes antioxidantes e fotoprotetores, contribuindo desta forma na transformação de conceitos populares para o científico.



## 2- REVISÃO DE LITERATURA

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – PELE

Além de ser um invólucro que recobre o nosso corpo, a pele é uma fronteira ativa entre o organismo e o meio ambiente. Considerada como órgão verdadeiro, possui arquitetura complexa apresentando múltiplas e precisas funções. Constitui, antes de tudo, a primeira linha de defesa contra agressões do meio ambiente, não sendo de maneira nenhuma uma barreira intransponível (BOUWSTRA *et al.*, 2003; GONÇALVES, 2000; RANGEL, 1998). É o órgão mais extenso do corpo humano e corresponde a cerca de 5% do peso total corporal, apresentando variações de espessura e valor de pH de acordo com as regiões corpóreas (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

A pele humana é composta por três camadas denominadas epiderme (camada mais superficial), derme (camada intermediária) e hipoderme ou tecido celular subcutâneo (camada profunda) (Figura 1).

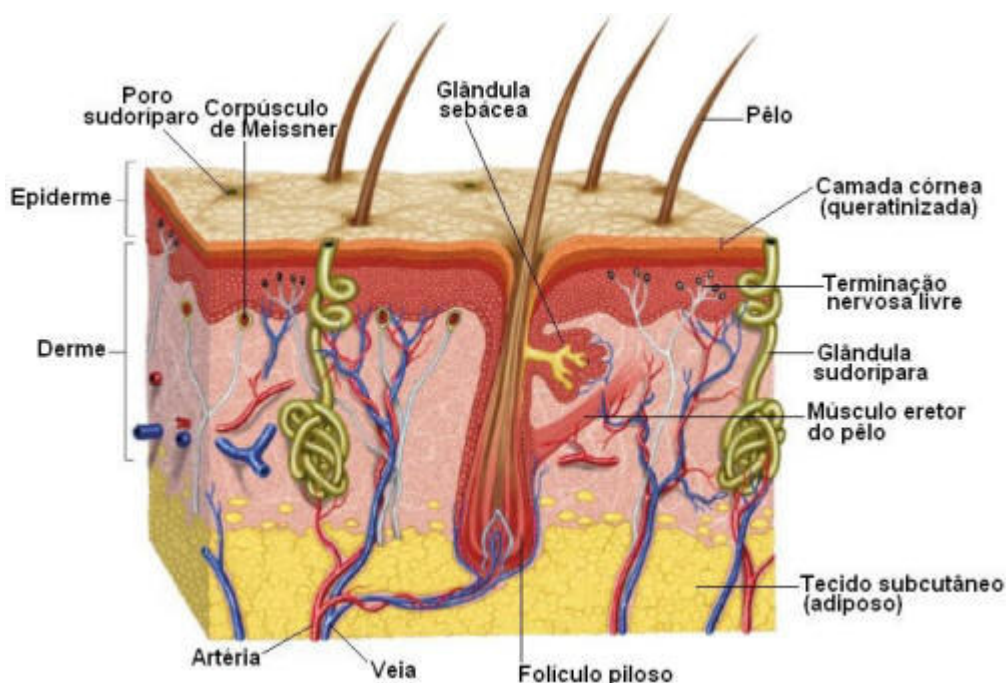


Figura 1 – Estrutura da pele (www.afh.bio.br).

### 2.1.1 – EPIDERME

A epiderme é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo a camada mais externa do tecido cutâneo (GONÇALVES, 1999). Segundo KIM *et al.* (2007), é um epitélio versátil, cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam periodicamente.

A camada mais profunda da epiderme é denominada germinativa ou basal. Nela existem milhares de células de dois tipos principais: as primeiras chamadas melanócitos, são responsáveis pela coloração da pele, enquanto as segundas, os queratinócitos se renovam a cada dia, levando a formação de uma barreira natural. Essas células são nutridas por vasos sanguíneos localizados na derme. (KIM *et al.*, 2007).

Conforme chegam a superfície os queratinócitos sofrem modificações graduais na forma e na composição química tornando-se anucleadas quando atingem a camada córnea. Ocorre, assim, um deslocamento permanente e repetido de células, que a partir da camada basal atingem gradualmente a superfície da epiderme, para se desprenderem já mortas. Durante esse processo, os queratinócitos sintetizam um grande número de proteínas e lipídeos. O ciclo de queratinização é a transformação dos queratinócitos em células córneas mortas: forma-se a queratina, proteína insolúvel, produzida pela epiderme; há progressiva perda de água; decomposição do citoplasma e do núcleo. As células que sofrem queratinização são chamadas queratinócitos, têm formato hexagonal e originam os lipídeos encontrados no estrato córneo. (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

O estrato córneo, camada mais superficial da pele, é menos permeável, possui maior teor de lipídeos que formam membranas lamelares intercelulares; suas células não possuem núcleo nem organelas e comporta-se como uma excelente barreira, protegendo o organismo da desidratação (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998). Sua importância deve-se à disposição estratificada, ao alto conteúdo em lipídeos e queratina e ao baixo teor de

---

hidratação, atuando assim na barreira epidérmica (BENY, 2000; VIGLIOGLIA, 1989). Embora seja uma membrana muito fina, comporta-se como eficiente barreira química e física, protegendo nosso corpo contra perda de água através da pele (desidratação), bem como impede a entrada de agentes infecciosos e tóxicos para a derme (BENY, 2000; VIGLIOGLIA, 1989).

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

Além dos queratinócitos outras células epiteliais são encontradas na epiderme:

- Células de Langerhans: nos estratos intermediários da epiderme tem função imunológica;
- Células de Merkel: no estrato basal ou germinativo, têm a função sensorial, pois possui terminações nervosas sensitivas, que se ligam às fibras do SNC;
- Melanócitos: na camada basal, têm a função de produzir melanina (substância responsável pela coloração da pele e proteger naturalmente contra os raios solares) (LEONARDI, 2000).

### **2.1.2 – DERME**

A derme, também denominada de tecido de sustentação, é um tecido conjuntivo denso constituído por células e abundante matriz extracelular. Tem como funções nutrição e sustentação da epiderme (GONÇALVES, 1999; PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

É neste tecido de sustentação, que é atravessado por inúmeros vasos e nervos, no qual estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos, estruturas sensoriais e unhas. Considerada como verdadeiro “reservatório” de água é capaz de armazenar, trocar e fornecer variadas quantidades de água em função das necessidades do organismo (BAUMANN, 2006; PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

Esta camada é constituída basicamente por dois tipos de células: fixas (fibroblastos) e “migratórias”. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese das diferentes macromoléculas que compõem a matriz extracelular, enquanto as células migratórias participam da defesa do organismo (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina, inseridas na substância fundamental, material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas, que são representadas por ácido hialurônico, glicosanimoglicanos e glicoproteínas de estrutura (VIGLIOGLIA, 1989).

De acordo com as duas diferentes estruturas encontradas na derme, esta é dividida em derme superficial ou papilar e reticular ou córion. A derme superficial é representada pelas papilas dérmicas (região irregular de contato com a epiderme), onde há presença de finas fibras de colágeno (reticulina) e elásticas que estão organizadas em redes frouxas, sendo esta última, fixa à junção dermoepidérmica. Contêm capilares sangüíneos e linfáticos e numerosas terminações nervosas, sendo responsável pelas trocas nutritivas com as camadas mais profundas da epiderme. A derme reticular é o tecido de sustentação compressível, extensível e elástico da epiderme, formado por tecido conjuntivo denso, cujas fibras de colágeno formam feixes cada vez mais espessos em função da profundidade e entrelaçadas às fibras elásticas (BAUMANN, 2000; PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

### 2.1.3 – HIPODERME

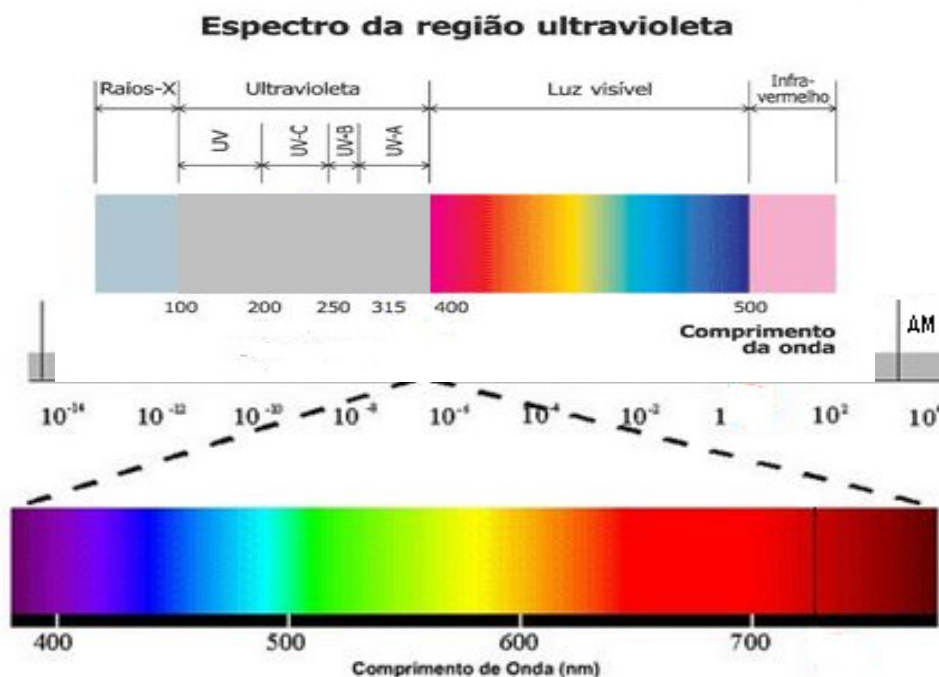
A hipoderme, camada mais profunda da pele também conhecida como camada subcutânea de gordura, é formada por uma variedade de tecido conjuntivo denominado de tecido adiposo, que entre outras funções, é responsável pelo armazenamento de nutrientes e energia para o organismo, modelando a silhueta corporal em função da idade, do sexo e do estado nutricional (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998). Apresenta ainda como funções, proteção mecânica, pois se comporta como verdadeiro amortecedor que atua suavizando traumas e isolante térmico, conservando a temperatura corporal (RANGEL, 1998; VIGLIOGLIA, 1989).

## 2.2 – RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)

A maior parte da energia do Sol atravessa a atmosfera e aquece a superfície da Terra, os oceanos e a atmosfera. Mas a Terra não pode aquecer indefinidamente e, para manter o equilíbrio térmico, a Terra aquecida emite energia para o espaço sob a forma de radiação infravermelha (calor). À medida que a superfície terrestre emite calor, uma boa parte dela é absorvida pelas nuvens e por alguns gases do efeito estufa da baixa atmosfera (vapor-de-água, dióxido e monóxido de carbono, metano, óxidos de azoto, etc). Este calor agora absorvido é de novo reemitido em todas as direções. Cria-se, assim, um ciclo de absorção e reemissão de calor que é repetido até que toda a energia se dissipe para o espaço (COUTEAU *et al.*, 2001).

A radiação eletromagnética emitida pelo sol mostra um largo espectro de comprimento de onda e é uma fonte de energia natural que possui um grande potencial de utilização devido à sua abundância e acessibilidade. Pode ser dividida em duas regiões maiores de acordo com a capacidade de ionização atômica: radiação ionizante e radiação não-ionizante. A radiação ionizante, por sua vez, é dividida em raios-X e raios gama, embora altamente prejudicial, não penetra na atmosfera terrestre; enquanto a radiação não-ionizante (**Figura 2**) subdivide-se em

radiação ultravioleta, luz visível e radiação infravermelho (KIRCHOFF, 1995). Todo esse espectro de radiação é comumente classificado de acordo com seu comprimento de onda ( $\lambda$ ).



**Figura 2** – Espectro da radiação eletromagnética solar. Em destaque radiação solar não-ionizante ([www.uvlife.com.br/o\\_que\\_e\\_uvc.html](http://www.uvlife.com.br/o_que_e_uvc.html), [sergiomatiasvialonga.blogspot.com/2008/05/esp...](http://sergiomatiasvialonga.blogspot.com/2008/05/esp...)).

A radiação UV é, subdividida em três regiões conforme seus efeitos biológicos o que depende do comprimento de onda e conseqüentemente, da quantidade de energia: UVA (bronzeante), UVB (eritematosa) e UVC (germicida). Os efeitos adversos dos raios UV no homem incluem queimadura solar, conjuntivite, câncer de pele, envelhecimento precoce, entre outros. Em contraste, o fenômeno vital de fotossíntese das plantas e síntese de vitamina D são exemplos benefício da luz UV no meio ambiente (MURPHY, 2002; GRUIJL *et al.*, 2001; NORVAL, 2001).

### 2.2.1 – EFEITOS DA RADIAÇÃO UV SOBRE A PELE - FOTOENVELHECIMENTO

Mesmo sendo um pré-requisito para a vida, a luz solar pode ser extremamente nociva à saúde humana. Apesar de não penetrar profundamente no organismo, atinge as partes externas do corpo (pele, olhos e mucosas) e uma exposição excessiva ao sol está associada ao aumento nos riscos de câncer de pele, fotoenvelhecimento, cataratas e outras doenças oftalmológicas. Pode também afetar o sistema imune comprometendo a eficácia dos programas de vacinação (MURPHY, 2002; GRUIJL, 2001; NORVAL, 2001).

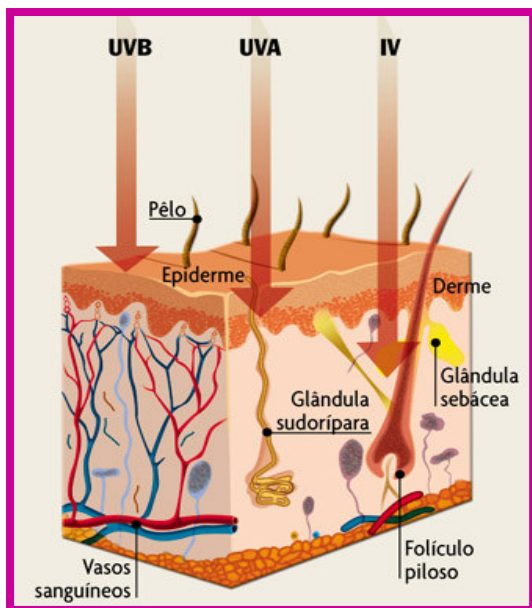
Os efeitos nocivos da radiação solar, às pessoas saudáveis, podem ser divididos em agudos e graves (FERRARI, 2002). São efeitos agudos: eritema calórico, reações de fotossensibilização induzida por droga, agravamento de doenças e alergias. São considerados efeitos crônicos, o fotoenvelhecimento da pele, câncer de pele e diminuição da imunidade cutânea (FITZPATRICK; PATHAK, 1974; KLIGMAN; KLIGMAN, 1986; LEVER, 1991).

A exposição excessiva resulta em severo estresse oxidativo nas células da pele através de interações com cromóforos intracelulares e fotossensibilizadores, resultando em danos transitórios ou permanentes; e pela ativação de sinalizadores citoplasmáticos de vias de transdução de sinais relacionados com o crescimento, a diferenciação, o envelhecimento e a degradação do tecido conjuntivo (FERRARI, 2002).

A interação entre a pele e a luz solar é inevitável. O potencial de dano depende do tipo e da duração da exposição. A luz solar tem efeitos profundos sobre a pele, e está associada a uma variedade de doenças (MURPHY, 2002; GRUIJL *et al.*, 2001; NORVAL, 2001).

A luz UV causa a maioria das reações cutâneas fotobiológicas. Ela é dividida em UVC (200 – 290nm), UVB (290 – 320nm) e UVA (320 – 400nm). O UVC é quase completamente absorvido pela camada de ozônio; o UVB causa eritema, pigmentação e principalmente alterações que induzem ao câncer cutâneo; o UVA, de maior penetração, além da





**Figura 3** – Representação esquemática da penetração de diferentes radiações na pele (LAWRENCE, 2001).

pigmentação e alterações que induzem ao câncer, é o principal indutor de fotossensibilidade (**Figura 3**) (COUTEAU *et al.*, 2001).

Um dos principais efeitos normais, benéficos e bem definidos da radiação UV na pele é o fotoquímico que leva à produção de vitamina D3. Também contribui em certos tratamentos de doenças como psoríase (FERRARI, 2002; WILKINSON; MOORE, 1990).

O fotoenvelhecimento consiste nas alterações cutâneas resultantes de exposição solar crônica (**Tabela 1**). A pele fotoenvelhecida é áspera, enrugada, com coloração amarelada pela diminuição dos vasos sanguíneos, despigmentação mosqueada provocada pela estimulação dos melanócitos pelos raios ultravioleta (RUV), telangiectasias que surgem pelo alargamento de pequenos vasos, rugas finas e rítides actínicas devido ao enfraquecimento dos tecidos de suporte, perda da elasticidade e aparecimento de lesões cancerosas pré-malignas e malignas (FITZPATRICK; PATHAK, 1974; KLIGMAN; KLIGMAN, 1986; LEVER, 1991).

O fotoenvelhecimento da pele é um processo biológico complexo que afeta várias camadas da mesma, sendo que o maior dano é observado no tecido conjuntivo da derme (KLIGMAN; KLIGMAN, 1986). As pessoas ficam com a aparência envelhecida, quando a pele perde a firmeza e tonicidade, aparecendo rugas (MURPHY, 2002).

**Tabela 1** – Alterações cutâneas induzidas pelo sol (MURPHY, 2002)

---

**ALTERAÇÕES DE TEXTURA**

Elastose solar

Pele espessada, enrugada, amarelada.

Atrofia

Adelgamento da pele; rugas finas, vasos sangüíneos proeminentes, hematomas e lacerações fáceis da pele, freqüentemente com muitas cicatrizes lineares.

Rugas

Profundas – não desaparecem ao esticar a pele

A pele espessada é cruzada por linhas profundas, criando padrões romboidais

---

**ALTERAÇÕES VASCULARES**

Eritema difuso

Mais aparente em pessoas de pele clara.

Equimoses e pseudocicatrizes estreladas

Sangramento na pele segue trauma leve – somente nas superfícies expostas do dorso das mãos e dos braços; associado atrofia, facilidade de laceração da pele e cicatrizes lineares.

Telangiectasias - Bochechas, nariz e orelhas.

Lago venoso

Vasos ectásicos redondos de cor púrpura – lábio inferior e orelhas.

---

**ALTERAÇÕES DA PIGMENTAÇÃO**

Sardas

Máculas pequenas, ovais, marrons – primariamente na face.

Lentigo

Máculas marrons grandes – face, dorso das mãos, braços, tórax, parte superior do dorso.

Hipomelanose gutata

Máculas discretas, redondas, brancas – parte inferior das pernas e dos braços.

Pigmentação marrom ou branca (irregular)

Marrom profunda com áreas de hipopigmentação.

Poiquidermia de Civatte – tórax e pescoço

Pigmentação reticular marrom-avermelhada com telangiectasias, atrofia e folículos pilosos proeminentes.

---

**ALTERAÇÕES PAPULOSAS**

Nevos

Mais numerosos nas superfícies expostas ao sol, em indivíduos predispostos.

Pápulas amarelas (elastose solar)

Pápulas amarelas opacas a brilhantes que podem coalescer formando placas.

Ceratose seborréica

Lesões superficiais discretas (aderidas) – mais numerosas em áreas expostas ao sol; planas nas extremidades, elevadas no tronco.

Comedões e cistos em torno dos olhos (síndrome de Favre-Racouchot)

### 2.3 – SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV

A pele constitui uma considerável proteção para a penetração de raios ultravioleta. Os sistemas naturais que previnem os danos solares são formados pela secreção sudorípara, pigmentação e pela camada córnea (BARTH; SANTOS; SOARES, 2000; FERRARI 2002).

Na secreção sudorípara existe um componente, o ácido urocânico (ácido 4-imidazoilacrílico), capaz de absorver radiações com comprimento de onda máximo cujas propriedades absorventes se situam na faixa das radiações UVB, com o máximo de absorção em 277nm (BAUMANN, 2005).

A proteção obtida pela pigmentação é devido à melanina (eumelanina), pigmento biológico presente na pele, cabelos e olhos. A concentração de melanina na pele reduz a alvura. Sua absorção de radiação ocorre numa extensa faixa de comprimentos de onda, desde

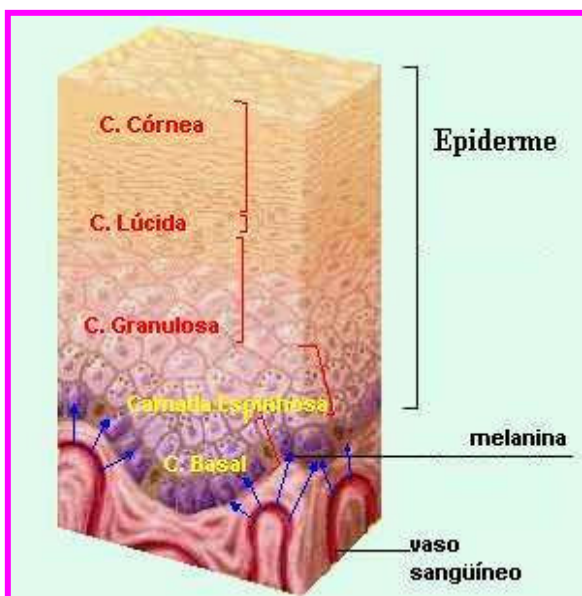


Figura 4 – Estrutura da Epiderme (LÉPORI, 2002).

o ultravioleta até as regiões próximas do infravermelho. É bioquimicamente considerado um radical livre não reativo, que neutraliza e separa radicais livres na pele e é finalmente desprendido com o estrato córneo. Apresenta sinergia com os outros antioxidantes como o tocoferol. Nas células observa-se que o pigmento tende a cobrir a parte superior do núcleo para proteger o DNA celular do dano que possa ser ocasionado pela radiação UV (LÉPORI, 2002).

A camada córnea ou estrato córneo além de funcionar como barreira à perda de água do organismo para o meio ambiente e contra a penetração de produtos do meio ambiente (Figura 4), funciona também como barreira à luz solar, pois reflete de 5% a 10% a luz incidente. A pele que possui estrato córneo mais fino é muito mais sensível a radiação UV e

pode ser queimada ou lesionada com mais facilidade do que aquela dotada de uma camada córnea mais espessa. (LÉPORI, 2002).

## 2.4 – PROTETOR SOLAR

A necessidade de nos proteger do sol aumentou tanto a ponto de esquecermos que o mesmo já reinou imponente. Civilizações antigas, como egípcia, grega e romana, cultuavam o sol como divindade e os médicos recomendavam a exposição à luz solar para evitar doenças (SCHULLER; ROMANOWSKI, 1999).

O primeiro protetor realmente eficaz foi desenvolvido pelo farmacêutico americano Benjamin Greene, em 1944, após observar as queimaduras na pele dos soldados que voltavam da Segunda Guerra. Era uma composição à base de petróleo, de cor vermelha e bastante viscosa. A marca foi registrada como Coppertone (HENRY; KULLAVANIJAYA, 2005).

Existem hoje 38 compostos listados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2004) que agem como protetores solares (**Tabela 2**) (HENRY; KULLAVANIJAYA, 2005).

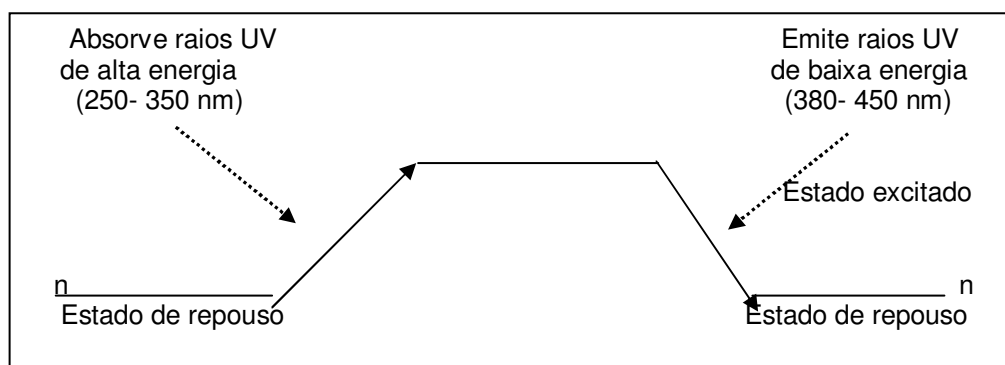
**Tabela 2** – Nomenclatura dos filtros solares segundo a ANVISA e ao INCI (nomenclatura pelo INCI, fonte itálico)

Nome – INCI	Concentração Máxima Permitida
Sulfato de Metila de N, N, N- trimetil - 4-(2,oxoborn - 3 - ilidenometil) anilínio <i>Camphor Benzalkonium Methosulfate</i>	6%
3, 3` - (1, 4 - fenilenodimetileno)bis (ácido 7, 7 - dimetil - 2 - oxo - biciclo - (2.2.1) 1-heptilmetanosulfônico e seus sais <i>Terephthalylidene Dicamphor Sulfonic Acid and Salts</i>	10% (expresso como ácido)
1 -(4 - terc - butilfenil) - 3 - (4 -metoxifenil) propano - 1, 3 - diona <i>Butyl Methoxy Dibenzoil Methane</i>	5%
Ácido alfa - (2 - oxoborn - 3 -ilideno) tolueno - 4 - sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina <i>Benzylidene Camphor Sulfonic Acid and Salts</i>	6% (expresso como ácido)
2 - Ciano - 3, 3` - difenilacrilato de 2 -etilexila <i>Octocrylene</i>	10% (expresso como ácido)
4 - Metoxicinamato de 2 - etoxietila <i>Cinoxate</i>	3%

2, 2` - dihidroxi - 4 - metoxibenzofenona <i>Benzophenone</i> – 8	3%
Antranilato de mentila <i>Methyl Antranilate</i>	5%
Salicilato de trietanolamina <i>tea Ssalicilate</i>	12%
2, 2`, 4, 4` Tetrahidroxibenzofenona <i>Benzophenone</i> – 2	10%
Ácido 2 - fenilbenzimidazol - 5 - sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina <i>Phenylbenzylimidazol Sulfonic Acid and Sodium , Potassium, Tea Salts</i>	8% (expresso como ácido)
4 - Metoxicinamato de 2 - etilhexila <i>Octyl or Ethylhexyl Methoxycinnamate</i>	10%
2 – Hidroxi - 4 - metoxibenzofenona (Oxibenzona) <i>Benzophenone</i> - 3	10%
Ácido 2 - hidroxi - 4 - metoxibenzofenona - 5 - sulfônico e seu sal sódico (Sulisobenzona e Sulisobenzona sódica) <i>Benzophenone - 4 (Acid) Benzophenone - 5 (Na )</i>	10% (expresso como ácido)
Ácido 4 - aminobenzóico <i>Paba</i>	15%
Salicilato de homomentila <i>Homosalate</i>	15%
N - Etoxi – 4 - aminobenzoato de etila <i>Peg - 25 Paba</i>	10%
4 - Dimetil-aminobenzoato de 2 -etilhexila <i>Octyl or Ethylhexyl Dimethyl Paba</i>	8%
Salicilato de 2- etilhexila <i>Octyl or Ethylhexyl Salicilate</i>	5%
4 - Metoxicinamato de isopentila <i>Isoamyl -Methoxycinnamate</i>	10%
3 - (4` - metilbenzilideno) - d - 1 -cânfora <i>4 - Methyl Benzylidene Camphor</i>	4%
3 – Benzilideno cânfora <i>3- Benzylidene Camphor</i>	2%
2, 4, 6 – Trianilin - (p - carbo - 2` - etil -hexil - 1` - oxi) - 1, 3, 5 - <i>Triazina Octyl or Ethylhexyl Triazone</i>	5%
Óxido de zinco <i>Zinc Oxide</i>	25%
2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-{2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)-disiloxanil}propil}fenol <i>Drometrizole Trisiloxane</i>	15%
Ácido benzóico,4,4` -[[6-[[4-[[1,1-dimetil-etil]amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etilhexil) <i>Diocetyl or Diethylexyl Butamidotriazone</i>	10%
2,2` -metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametil-butyl)-1,1,3,3-fenol Metileno bis-benzotriazolil tetraetil butil fenol <i>Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol</i>	10%
Sal monossódico do ácido 2,2` -bis-(1,4-fenileno)- 1H-benzimidazol-4,6-dissulfônico <i>Bisimidazylate</i>	10% (expresso em ácido)
(1,3,5)-triazina-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidróxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil) <i>Anisotriazine</i>	10%
Polímero de N - {(2 e 4)[(2 - oxoborn - 3 -ilideno) metil] benzil} acrilamida <i>Polyacrylamidomethyl Benzylidene Camphor</i>	6%
Dióxido de titânio <i>Titanium Dioxide</i>	25%

### 2.4.1 – FILTROS QUÍMICOS

Os protetores solares químicos são compostos orgânicos preparados sinteticamente que podem ser amplamente rotulados como substâncias que absorvem o UVB ou UVA. Esses agentes geralmente incolores impedem que a radiação penetre na epiderme (**Figura 5**), atuando com protetores, pois absorvem e refletem a radiação UV (SHAATH, 1986).



**Figura 5** – Representação esquemática do processo de absorção da radiação UV pelos filtros químicos (SHAATH, 1986).

Entre os filtros químicos utilizados, o grupo dos cinamatos tem sido amplamente usado. O metoxicinamato de octila (OMC), com uma absorção máxima de UVB de 311nm, é o mais comumente utilizado. Vários produtos cosméticos, incluindo bases de maquiagens, batons e condicionadores sem enxágüe contêm OMC. Como são fracamente solúveis em água, os cinamatos são geralmente incluídos nos produtos resistentes a água (RIETSCHEL; FOWLER, 2001).

Vários pesquisadores (SCHAUDER; IPPEN, 1997; BERNE; ROS, 1998) demonstraram, através de testes de fototoxicidade e alergenicidade, que o OMC é um filtro solar seguro e eficaz, e apresenta baixa incidência de reações fotossensibilizante e/ou fotoalérgicas. Pacientes alérgicos a esse composto também podem ser alérgicos a fragrâncias e aromatizantes que contenham aldeído cinâmico e óleo de canela (RIETSCHEL; FOWLER, 2001). XU *et al.* (2001) estudando o OMC em cultura celular, relataram que o mesmo não

---

apresentou fotossensibilização em melanócitos, queratinócitos e em outras duas linhagens celulares (Colo 16 e MM96L).

CONDORÍ *et al.* (2001) observaram e identificaram produtos da fotodegradação do OMC após a exposição solar. Mas, de acordo com AMORI *et al.* (2001), quando este filtro se encontra associado a outro, a decomposição após exposição ao simulador solar é diminuída.

Uma propriedade relevante do OMC é a possibilidade de associação com outros filtros solares. BARTH; SANTOS; SOARES (2000) analisaram o Coeficiente de Carga de Filtro Solar (CCFS) que informa quais os filtros que devem ser associados para obterem-se produtos de altos valores de FPS. O OMC foi classificado com um filtro de médio stress, apresentando média sobrecarga sobre a pele, sendo então recomendado para a associação, obtendo altos valores de FPS, empregando baixas concentrações.

#### **2.4.2 – FILTROS FÍSICOS**

Protetores solares por barreira, conhecidos mais comumente como filtros solares físicos, dissipam, refletem a radiação UV ou adsorvem fisicamente e raramente estão associados com reações alérgicas. Esses protetores solares bloqueiam a variação mais ampla de luz, incluindo as radiações UV, visível e infravermelho. Normalmente são recomendados para a exposição intensa ao sol, como praia, ou em altas altitudes. Pacientes com pele sensível apresentam maior probabilidade de tolerar esse filtros físicos (BAUMANN, 2005; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>), óxido de magnésio, óxido de ferro e óxido de zinco (ZnO) são ingredientes primários nos protetores solares físicos. As formulações necessitam de uma espessa camada de aplicação, mancham roupas e podem ser comedogênicas. Alguns desses agentes são tão opacos que são visíveis, e, conseqüentemente são esteticamente inaceitáveis para a maioria das pessoas. Como apelo de uso, alguns fabricantes ainda colocaram no

---

mercado produtos opacos em cores brilhantes especificamente destinados para o uso em crianças, devido ao nível de proteção atingida (BAUMANN, 2005).

### **2.4.3 – FILTROS SOLARES QUÍMICOS DE ORIGEM NATURAL**

Vários extratos e óleos de plantas têm sido utilizados em cosméticos como filtros solares devido à ação fotoprotetora. Apresentam moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros químicos sintéticos. A absorção máxima desses produtos não é muito bem definida porque são misturas de diferentes moléculas mais e menos ativas. Porém podem ser utilizados como potencializadores do FPS (BAUMANN, 2005).

Assim como a *Aloe vera*, outras plantas também revelaram interessante potencial fotoprotetor: *Matricaria chamomilla*, *Hamamelis virginiana*, *Crocus sativus*, inclusive o própolis (FERRARI, 2002; HU; WANG, 1998).

A incorporação de extrato liofilizado de *Rosmarinus officinalis* a uma loção cremosa contendo filtro químico sintético resultou em aumento do FPS final. Apesar do aumento não ter sido intenso, a identificação de algumas substâncias com ação antioxidante, determina uma segunda função, a ação sobre os radicais livres formados na epiderme, tornando-o interessante em preparações fotoprotetoras (GARCIA; SANTOS; LIMA, 1995).

### **2.4.4 – FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

A determinação do FPS é uma técnica que comprova a eficácia dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Como o UVB é responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele que é capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar (DAMIANI *et al.*, 2005).



O FPS é determinado a partir de um cálculo que inclui os valores de tempo mínimos necessários para detectar eritemas, com e sem proteção da pele, como demonstra a fórmula a seguir:

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEMc}}{\text{DEMs}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: DEMc é o eritema minimamente detectável com fotoproteção e o DEMs é o eritema minimamente detectável sem fotoproteção (ANVISA, 2002; DAMIANI *et al.*, 2005).

Isto significa que, se um indivíduo pode permanecer durante 10 minutos no sol sem se queimar sem utilizar qualquer produto fotoprotetor, quando utilizar filtro solar com FPS 15, poderá permanecer 150 minutos (10 X 15) sob o sol que estará protegido, considerando que seja utilizado da maneira recomendada (quantidade, reaplicações, etc.) (EL- BURY *et al.*, 2006).

Apesar das pessoas acreditarem que a partir de FPS 20 todos os filtros têm o mesmo poder de proteção, a realidade é que a partir de um determinado valor de FPS (por volta de 15) o bloqueio UV não aumenta na mesma proporção que o FPS, isto é, filtro com FPS 30 não oferece o dobro da proteção de um filtro com FPS 15. Todavia, o tempo que o filtro pode absorver as radiações UV será maior quanto maior for o FPS, diminuindo a frequência das reaplicações (HENRY; KULLAVANIJAYA, 2005).

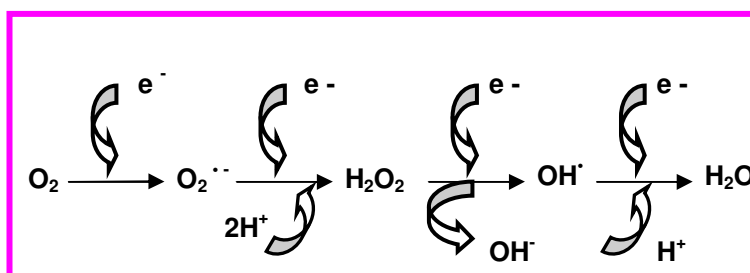
## 2.5 – RADICAIS LIVRES E OS ANTIOXIDANTES

Mudanças fisiopatológicas do tecido danificado são ativadas no local pela liberação de mediadores inflamatórios iniciando uma cascata de reações que aumentam a resposta inflamatória (LUND, 1992). Recentes pesquisas demonstram que radicais livres estão prontamente envolvidos no processo inflamatório provocado por queimaduras. Estas moléculas estão entre os metabólitos postulados com participação nos processos

fisiopatológicos, como por exemplo, no aumento da permeabilidade capilar promovendo a formação do edema na zona da queimadura (VORAUER-UHL *et al.*, 2001; LUND, 1989).

Os radicais livres também são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses compostos são formados quando as moléculas de oxigênio se combinam com outras moléculas, gerando um grande número de elétrons livres. Uma molécula de oxigênio com elétrons pareados é estável, entretanto, o oxigênio com um elétron sem par é “reativo” porque ele capta elétrons de componentes vitais, danificando-os (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

A geração dessas espécies pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos, dentre os quais se destaca a fosforilação oxidativa (**Figura 6**), reação que ocorre na mitocôndria (parte da célula responsável pela produção de energia e respiração da mesma) e gera energia no organismo dos mamíferos. A molécula de oxigênio ( $O_2$ ) que participa da reação recebe 4 elétrons, reduzindo-se até formar água. Do oxigênio consumido parte não é reduzida completamente (2–5%) produzindo EROs como produtos intermediários. Com este oxigênio altamente reativo do processo, os radicais são gerados e podem subsequentemente atacar células em nosso corpo (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).



**Figura 6** – Geração de EROs a partir da redução do oxigênio molecular na reação de fosforilação oxidativa (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

As espécies reativas de oxigênio podem afetar o DNA, elementos citoesqueléticos, as proteínas e as membranas celulares, e estão implicadas no processo geral de envelhecimento. Os radicais livres, que podem causar a inflamação, bem como a peroxidação lipídica, outra seqüela da produção de radicais livres, causam danos às membranas e podem provocar o

---

envelhecimento da pele, arterosclerose e outros sinais de envelhecimento (FREI; HIGDON, 2003; HALLIWELL *et al.*, 1995; OFFORD *et al.*, 2002; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006).

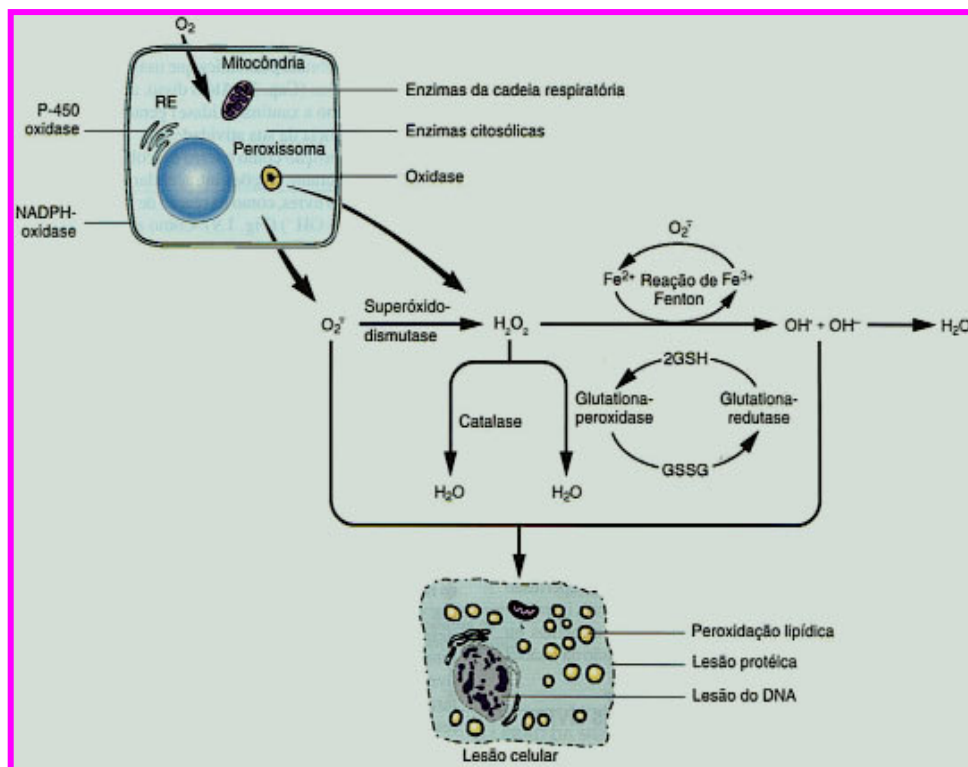
Os radicais livres são formados naturalmente através do metabolismo humano normal, mas também podem ser aumentados como resultado da poluição do ar, tabagismo, radiação, álcool, entre outros. Os fatores externos podem ser fontes de espécies reativas de oxigênio como os superóxidos, ânion hidroxila, peróxido de hidrogênio e unidade simples de oxigênio (FREI; HIGDON, 2003; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006).

O corpo desenvolve mecanismos de defesa, conhecidos como antioxidantes (**Figura 7**), que protegem contra o ataque desses radicais livres. Dentre os antioxidantes presentes naturalmente nas células da pele estão a superóxido dismutase, catalase,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona e glutatona. Muitos desses mecanismos, entretanto são inibidos pela luz UV e luz visível. De fato, a exposição à luz UV causa aumento da formação de radicais livres (CASAGRANDE *et al.*, 2006; FREI; HIGDON, 2003; HALLIWELL *et al.*, 1995; OFFORD *et al.*, 2002; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006).

Sabe-se que o dano induzido à pele pela radiação UV é em parte mediado pelos intermediários do oxigênio reativo. Se os antioxidantes podem neutralizar alguns dos radicais livres resultantes, podem ser capazes de diminuir o dano induzido pela radiação UV à pele (FREI; HIGDON, 2003; HALLIWELL *et al.*, 1995; OFFORD *et al.*, 2002; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006).

Os antioxidantes podem ser particularmente úteis nas alterações da pele induzidas pela radiação UVA que se acredita serem determinantes, em grande parte, pelo processo oxidativo. De fato, a aplicação tópica de antioxidantes eleva a dose mínima de UVA necessária para induzir um escurecimento pigmentar imediato e diminuir a severidade das fotodermatoses

induzidas pela radiação UVA (CASAGRANDE *et al.*, 2006; FREI; HIGDON, 2003; HALLIWELL *et al.*, 1995; OFFORD *et al.*, 2002; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006).



**Figura 7** – Formação de radicais livres e mecanismos antioxidantes biológicos ([www.smokersrx.com/why\\_skin\\_ages.html](http://www.smokersrx.com/why_skin_ages.html))

Existe hoje um grande apelo para produtos cosméticos com antioxidantes e para isto, testes devem ser feitos para comprovar a atividade proposta nesses produtos. Um exemplo de método *in vitro* para a avaliação da capacidade antioxidante é a redução do NBT (azul de nitro tetrazólio) ou citocromo C pelo superóxido, que é fornecido pelo sistema xantina-xantina oxidase. Outros ensaios *in vitro* baseiam-se no seqüestro do radical hidroxila tendo como substrato a desoxirribose; análise da capacidade doadora de  $H^+$  para o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); inibição da peroxidação lipídica e inibição da redução de quimioluminescência (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Um dos métodos mais adequados para avaliar a capacidade antioxidante em formulações cosméticas é o DPPH•, que é um radical estável em solução e que reage com

compostos capazes de doar elétrons. Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH•, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005). Após o equilíbrio da reação mede-se a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% do DPPH• (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

As vantagens desse método são: avaliar grande quantidade de amostras em um período curto de tempo; é um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado, e permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol. Em contrapartida, o valor do pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

## 2.6 – ÓLEO DE OLIVA

A oliveira é uma das plantas mais antigas conhecidas pela humanidade. Os primeiros cultivos tiveram início por volta do ano 5000 a.C., na região mais oriental do mediterrâneo. Com o passar do tempo, seu plantio se espalhou de Creta para a Palestina, Israel, Síria, Turquia, Chipre e Egito. Até o ano de 1500 a.C., a Grécia era o maior produtor. Com a expansão das colônias gregas, o cultivo de oliveiras chegou à Itália, norte da África e, posteriormente, sul da França (KARAUGELOPOULOS, *et al.*, 2007).

Os benefícios à saúde produzidos pelo óleo de oliva se devem basicamente às substâncias que contém. Além da gordura monoinsaturada, com todos os seus benefícios, o óleo de oliva é rico em polifenóis (substâncias químicas vegetais que são potentes antioxidantes). Ao prevenir as oxidações biológicas, os polifenóis reduzem a formação de radicais livres. Estes, através do dano celular que produzem, são promotores do

---

envelhecimento e das doenças crônico-degenerativas, como o câncer (SÁNCHEZ, *et al.*, 2007).

O método tradicional de obtenção do óleo, que é ainda usado em muitas regiões, consiste no esmagamento das azeitonas que foram previamente picadas e amassadas. A pressão aplicada à pasta de azeitonas separa os líquidos, o óleo e a água contida no vegetal, do material sólido e são separados por decantação. No processo moderno de obtenção do óleo, são utilizadas grandes centrífugas que fazem a separação do óleo. Nesta forma de extração, a pasta de azeitona fica de 30 a 40 minutos sendo homogeneizada (processo tecnicamente chamado de malaxar), o que permite que as pequenas gotas de óleo se agrupem. Nesta fase é adicionada água à mistura para melhorar a formação da pasta. Isto produz uma desvantagem importante em relação às qualidades benéficas do óleo, pois reduz a quantidade de antioxidantes, que são removidos por esta água (LOPEZ- FERIA *et al.*, 2006).

Os métodos de extração do óleo de oliva são efetivos e, se bem aplicados, podem produzir óleos de boa qualidade (LOPEZ- FERIA *et al.*, 2006).

Se altas temperaturas são aplicadas durante o processamento da pasta e da extração do óleo, haverá maior volatilização dos componentes, o que ocasiona diminuição do aroma e maior taxa de oxidação do óleo, reduzindo os polifenóis, as vitaminas e outros antioxidantes. O problema é que a elevação da temperatura aumenta o rendimento da extração, sendo mais lucrativo (LOPEZ- FERIA *et al.*, 2006).

A primeira classificação dos óleos de oliva se faz em dois grandes grupos: virgens e refinados. Os primeiros são produzidos a partir de processos físicos, sem nenhum tratamento químico, enquanto o segundo sofre tratamento químico (geralmente solventes) para neutralizar o gosto muito intenso e o conteúdo ácido (BENICASA *et al.*, 2007).

➤ Extra- virgem: óleo de oliva obtido da primeira pressão, com acidez não superior a 0,8%.

- Virgem: óleo de oliva extraído por meio físico (pode ser com temperatura de extração elevada), acidez menor que 2%.
- Óleo de Oliva: mistura de óleo de oliva virgem e óleo de oliva refinado, acidez no máximo 1% (BENICASA *et al.*, 2007).

### 2.6.1 – POLIFENÓIS

Os polifenóis constituem uma classe de produtos fenólicos presentes na natureza e encontram-se disponíveis nos frutos, vegetais, sementes, flores e cascas. Nos últimos anos tem sido motivo de muitos estudos, pois foram identificados como compostos que trazem algum benefício à saúde, desde a prevenção à cárie até ao câncer. Muito se tem dito a respeito da funcionalidade dos polifenóis que apresentam características anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas, anti-trombóticas, anti-microbianas, vasodilatadora e analgésica. Exercem estes benefícios pelo seu poder antioxidante (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

O nome polifenóis vem da nomenclatura *poli* que quer dizer muitos e de *fenol* que é um composto químico. O fenol é constituído por um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (OH). Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Esta classe de produtos é uma das que apresenta o maior grupo de substâncias conhecidas no reino vegetal (FILHO; SILVA; BOVERIS, 1999; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 1986).

Os polifenóis são produtos que fazem parte do metabolismo secundário das plantas (AGROFOOD, 2004) e atualmente encontra-se mais de 4000 estruturas fenólicas conhecidas (FILHO; SILVA; BOVERIS, 1999; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 1986). A grande variedade destes compostos se deve ao fato de estarem ligados com grupos hidroxilas, metoxilas e conjugados com açúcares (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 1986), sendo chamados de anglicona ou genina (SIMÕES; SPITZER, 1999).

## 2.7 – OLEO DE SEMENTE DE UVA

A videira é uma planta de clima temperado que é muito cultivada em várias regiões do mundo. No Brasil é cultivada na região Sul, mas seu cultivo vem aumentando na região Nordeste devido, principalmente, às técnicas de irrigação. Alemanha, França e Itália foram os primeiros países a beneficiarem o óleo de semente de uva, enquanto que na América do Sul foram Argentina e Chile. Os principais produtores mundiais deste óleo são Estados Unidos, Espanha e Itália (MIGUEL, 1983).

O óleo de semente de uva é rico em tocoferol (vitamina E- antioxidante), principalmente sob a forma de alfa-tocoferol. A vitamina E ou tocoferol atua de modo peculiar por se intercalar entre os lipídeos da camada mais externa da epiderme formando uma barreira protetora. A vitamina E age sinergicamente com a vitamina C durante a formação de fibras colágenas (GUERRA FILHO; FANAN, 1994; ESTEVE; KRIESTEN, 1990).

Também possui grandes quantidades de ácidos graxos, destacando-se o elevado teor de ácido linoléico (72- 75%), sendo esse teor bem menor nos óleo de girassol (60-62%) e óleo de milho (em torno de 52%) (CAO; ITO, 2003).

Extratos do óleo de semente de uva mostram-se importantes por possuírem bioflavonóides, complexo conhecido como *Procyanidolic oligomeric* (PCO ou OPC) que se acredita ser vinte vezes mais potente como removedores dos radicais livres que a vitamina C e cinquenta vezes mais potente que a vitamina E. Estes bioflavonóides atuam como removedores dos radicais livres, assim como, as vitaminas C, E e betacaroteno (CAO; ITO, 2003).

O óleo de semente de uva é extraído utilizando solventes como, por exemplo, o n-hexano, podendo ser obtido também por prensagem a frio, produzindo óleo de altíssima qualidade, mas essa extração é demorada e onerosa. Essa extração pode consumir 200 kg de



---

semente para produzir apenas 1 litro de óleo. O óleo de semente de uva apresenta cor amarelo esverdeado, sabor agradável e odor suave característico (CAO; ITO, 2003).

### 2.7.1 – TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

Os tocoferóis e tocotrienóis são conhecidos pelo poder de inibição dos processos de oxidação de lipídios em alimentos e sistemas biológicos. Os tocoferóis estão presentes em óleo vegetais e nas partes verdes das plantas, enquanto que os tocotrienóis podem ser encontrados nas sementes e cereais, como trigo, milho e arroz, e também em frutos oleaginosos como côco e algumas espécies de palmeiras. As denominações  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  dependerão dos radicais ligados à estrutura base dos tocoferóis e tocotrienóis (VASCONCELOS, 2005).

De acordo com FREGA; MOZZON; BOCCI (1998), é raro encontrar  $\delta$  tocotrienol na natureza, estando presente em poucas espécies, dentre elas *Amaranthus* sp, o farelo de arroz, a cevada, nas sementes de espécies da família Apiaceae e do urucum.

Esses compostos são importantes não somente para os sistemas biológicos e alimentos, mas também para impedir a auto-oxidação do óleo nas sementes vegetais. Enquanto existem muitos estudos *in vitro* e *in vivo* comprovando a atividade antioxidante dos tocoferóis, os estudos com os tocotrienóis são escassos, provavelmente em razão da dificuldade de encontrá-los (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998). A ação antioxidante desses dois compostos se deve principalmente a sua capacidade em doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, e com isso impedir a oxidação dos lipídeos (VASCONCELLOS, 2005).

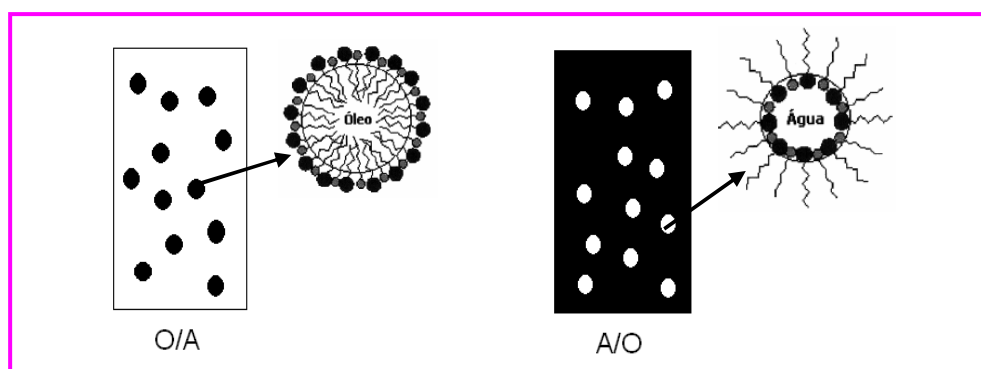
Muita importância tem se dado aos tocotrienóis por possuírem atividades biológicas importantes. Há estudos que sugerem a inibição do crescimento de células cancerígenas em glândulas mamárias e redução do risco de doenças cardíacas por essas moléculas, que podem

também prevenir outras patologias que se originam de estresse oxidativo (VASCONCELLOS, 2005; FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998).

## 2.8 – 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 em função de propriedades terapêuticas, e como veículos para transportar fármacos e agentes cosméticos através da pele (ECCLESTON, 1997).

A estrutura das emulsões consiste em gotículas da fase dispersa (ou 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 numa fase contínua oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa, conforme representado na **figura 8** (FORGIANINI *et al.*, 2001; TADROS; BECKER, 1983).



**Figura 8** – 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 agente emulsificante, algumas vezes chamados de tensoativos (CAPEK, 2004; HOMLBERG *et al.*, 2002; JEONG; OH; KIM, 2001; MORRISON; ROSS, 2002; PINHO; STORPIRTIS, 1998).

## 2.9 – NANOTECNOLOGIA EM COSMÉTICOS

A nanotecnologia aplicada à cosmética consiste em colocar princípios ativos em partículas pequenas, capazes de penetrar nas camadas mais profundas da pele, potencializando os efeitos dos produtos. Com isso, os chamados “nanocosméticos” (contém ingredientes obtidos por nanotecnologia) conseguem agir na camada basal, local de origem das células da pele (BAUMANN, 2005).

Segundo a Nanobiotec, organização nacional voltada para a área de nanobiotecnologia, no período de 1990 à 2005 houve mais de 500 publicações sobre o uso de nanotecnologia para o desenvolvimento de produtos dermocosméticos. Foram também registradas 312 patentes no mundo relativas a produtos cosméticos ou dermatológicos entre 1996 e 2005 (GUTERRES; PASA; PIMENTA, 2006). Empresas internacionais renomadas como L’Oreal, Lâncome, Anna Pegova, Pocter & Gamble, Chistian Dior, entre outras além das empresas brasileiras, pioneiras no mercado como Natura e O Boticário, lançaram produtos baseados em nanotecnologia. Esses produtos prometem maior hidratação, maior penetração de ativos que se destinam a agir na derme como, por exemplo, compostos que promovem aumento na síntese de colágeno e elastina, bem como melhora no aspecto sensorial de diversos produtos, incluindo os filtros solares (CAMARGO, 2008).

Na indústria cosmética, protetores solares possuem nanoestruturas que ajudam na qualidade desses produtos, principalmente quanto a produtos de FPS mais elevados. Nos protetores solares físicos, as partículas são pigmentos de um branco brilhante que refletem luz de todos os comprimentos de onda. Porém, nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  não refletem a luz visível por serem transparentes, porém ainda bloqueiem a luz UV. Assim, partículas de  $\text{TiO}_2$  em nanoescala proporcionam excelente proteção UV nas aplicações de filtro solar (FORTUNATO; 2005; GUTERRES; PASA; PIMENTA, 2006; STEINBERG, 2007).

Apesar de já conhecidas, as nanoemulsões só recentemente atraíram a atenção dos fabricantes de cosméticos. Esse desinteresse pode ter ocorrido pelos motivos que o preparo das nanoemulsões, em muitos casos, exige a aplicação de técnicas especiais, como homogeneizadores de alta pressão e ultrassônicos (FORTUNATO, 2005; KOTHEKAR, 2006; STEINBERG, 2007, TRINDADE, 2006).

Além dos equipamentos para a fabricação de nanoemulsões serem caros, o pouco conhecimento do mecanismo de produção de gotículas de dimensões nanométricas e do papel dos tensoativos e co-tensoativos também colaborou para deter o avanço das mesmas; bem como a falta de demonstração dos benefícios do uso de nanoemulsões em comparação com os sistemas clássicos de macroemulsões. Em termos fundamentais, a dificuldade de conhecimento da química interfacial envolvida na produção da nanoemulsão retardou o progresso das mesmas. Finalmente, havia o receio de enveredar por novos sistemas sem plena avaliação de custo/benefício, o que inibiu o uso de nanoemulsões em aplicações de cuidado pessoal. Apesar dessas dificuldades, várias empresas lançaram nanoemulsões no mercado e, nos próximos anos, os benefícios poderão ser avaliados. A utilização das nanoemulsões nos cosméticos depende da percepção e da aceitação do consumidor. Com a chegada de novos instrumentos homogeneizadores de alta pressão, a descoberta de técnicas, onde não é necessário o uso destes equipamentos e com a concorrência entre os fabricantes, o custo de produção das nanoemulsões deverá cair, aproximando-se do custo das tradicionais macroemulsões (FORTUNATO, 2005; KOTHEKAR, 2006; STEINBERG, 2007, TRINDADE, 2006).

## **2.10 – NANOEMULSÕES**





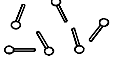
Nanoemulsões, também conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas, consistem em emulsões muito finas com glóbulos de diâmetros na faixa de

---

100 a 500 nm (FERNANDEZ *et al.*, 2004; NAKAJIMA; TOMOSSA; OKABE, 1993) ou 50 a 300 nm (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004). Segundo CAPÉK em 2004 as nanoemulsões apresentam aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200nm e aparência leitosa quando este se encontra entre 200 e 500nm (**Figura 9**).

Nanoemulsões, ao contrário de microemulsões, 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, ou seja, 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 grande redução na força de gravidade superada pelo movimento browniano (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004).

A granulometria do sistema também previne o fenômeno da coalescência, pois esses glóbulos não são facilmente deformáveis. Em contrapartida, 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 (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS, 2004; SONNEVILLE\_AUBRUN; SIMMONET; L'ALLORET, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006a).

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

**Figura 9** – Escala de granulometria das emulsões (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999).

### 2.10.1 – 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 penetração dos glóbulos através das rugosidades da pele, inclusive através de peles extremamente ásperas, possibilita maior capacidade de hidratação além de facilitar a penetração de ativos (TADROS, 2004; SONNEVILLE-ABRUM; SIMMONET; L'ALLORET, 2004).
- O diminuto tamanho dos glóbulos garante distribuição uniforme do produto sobre a pele (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).
- Quanto ao aspecto sensorial, a fluidez natural do sistema (em baixas concentrações de fase oleosa até 20%) confere às nanoemulsões características muito valorizadas em produtos cosméticos (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004; SONNEVILLE-ABRUM; SIMMONET; L'ALLORET, 2004).
- As nanoemulsões podem ser alternativas a lipossomas e vesículas (as quais possuem baixa estabilidade) e é possível em alguns casos obter estruturas líquido-cristalinas ao redor dos glóbulos (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004).

- Podem ser utilizadas como sistema de veiculação de fragrâncias ou ainda para fabricação de perfumes sem álcool (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004; BOUCHEMAL *et al.*, 2004).
- Podem ser esterilizadas por filtração devido ao diminuto tamanho dos glóbulos (SONNEVILLE-AUBRUM; SIMMONET; L'ALLORET 2004).

## 2.10.2 – 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).

### 2.10.2.1 – MÉTODOS QUE UTILIZAM ALTA ENERGIA DE EMULSIFICAÇÃO

A obtenção de nanoemulsões através do uso de homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores tem sido muito descrita na literatura (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004; SOLÉ, *et al.*, 2006). De maneira geral, a preparação de nanoemulsões através desses procedimentos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa as fases, oleosa e aquosa, são aquecidas separadamente e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta rotação (como Ultraturrax® e Politron®). A emulsão obtida na primeira etapa apresenta um tamanho de gotícula submicrométrico (entre 500 e 1000nm), influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após o resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através de homogeneizadores de alta pressão (BIVAS-BENITA *et al.*, 2004) ou microfluidizadores (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Os homogeneizadores de alta pressão consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positivo a qual injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em

---

uma válvula homogeneizadora (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001), enquanto que os microfluidizadores são constituídos de uma câmara de interação onde o fluido é injetado e homogeneizado por corte, impacto e cavitação. Fatores como temperatura, viscosidade e concentração da fase interna das emulsões influenciam nas características físico-químicas do produto final e a otimização das condições operacionais deve ser realizada para cada sistema desenvolvido e tipo de equipamento utilizado (LIEDTKE *et al.*, 2000; TADROS *et al.*, 2004).

O uso de ultrassom para a preparação de nanoemulsões também tem sido descrito por vários autores (NAIRN, 2000). Geralmente o fluido é primeiramente conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina, e a vibração desta produz ondas ultrassônicas, que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de tamanho reduzido (BOLDYREV, 1995; MAA; HSU, 1999). Os principais parâmetros que envolvem este procedimento de homogeneização são as propriedades interfaciais da emulsão, que podem ser controladas pela natureza e concentração dos tensoativos e pelas propriedades do óleo, em especial a tensão superficial e a viscosidade (DELAIR, 2004).

O uso de homogeneizadores e ultrassom pode conduzir à obtenção de nanoemulsões de propriedades físico-químicas equivalentes através da otimização das condições operacionais e da composição quali e quantitativa das formulações. 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 de gotícula, além de problemas relacionados às dificuldades de transposição de escala (TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004, SOLÉ *et al.*, 2006).



### 2.10.2.2 – 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; GARCIA; SOLANS, 2004).

Existem dois métodos de inversão de fases: transicional, conhecida também como método de inversão de fases pela temperatura (da língua inglesa: PIT= Phase Inversion Temperature) e emulsificação por inversão de fases pela alteração da fração volumétrica (da língua inglesa: EPI =Emulsion Phase Inversion) (MORAIS *et al.*, 2006a; MORAIS *et al.*, 2006b).

Para os tensoativos não iônicos polietoxilados, 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.*, 2006a; MORAIS *et al.*, 2006b).

Durante o aquecimento os grupos de óxido de etileno, responsáveis pela característica hidrofílica do tensoativo ficam “escondidos” e, conseqüentemente, há modificação da sua afinidade pelas fases. À medida que o sistema sofre resfriamento, o tensoativo passa por um ponto de curvatura zero e promove a mínima tensão superficial, o que predispõe a formação de nanoemulsões (FERNANDEZ *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006, SALAGER *et al.*, 2004; TADROS, 2004). O ponto de inversão no qual o tensoativo atinge a curvatura zero está diretamente relacionado ao equilíbrio da hidrofília e lipofília deste na interface do sistema.

Para que esse processo ocorra, a concentração do tensoativo deve ser superior à concentração micelar crítica (CMC) (BECHER; SCHICK, 1987; ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001; SAJJADI; ZERFA, 2003; SALAGER *et al.*, 2004; XIE; BROOKS, 2004). Pela técnica do PIT são formadas emulsões com tamanho de partícula muito pequeno que apresentam boa estabilidade (TADROS, 2004).

---

A transição espontânea da curvatura também pode ser obtida pelo método do EPI, alterando-se a fração volumétrica. Quando se deseja uma emulsão O/A, adiciona-se sucessivamente a fase aquosa na oleosa, sendo que os glóbulos de água são formados em uma fase oleosa contínua (microemulsão ou fase bicontínua A/O). Aumentando-se o volume da fração aquosa há uma inversão espontânea na curvatura do tensoativo ocorrendo mudança da emulsão A/O para O/A. Este processo é comum em sistemas no qual o tensoativo forma monocamadas flexíveis entre a interface água/ óleo formando uma microemulsão (fase bicontínua) ou fase líquido-cristalina no ponto da inversão (MARSZALL, 1987; FERNANDEZ *et al.*, 2004; SALAGER *et al.*, 2004; TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA, 2004).

Segundo a literatura, não apenas a mínima tensão interfacial produzida durante a inversão da curvatura do tensoativo, mas também a formação da fase bicontínua ou fase líquido-cristalina anterior ao lócus da inversão é estreitamente relacionada à formação de nanoemulsões, tanto no método do EPI quanto no método do PIT (FERNANDEZ *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2004; MORALES *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que a solubilização completa do óleo na fase bicontínua ou na fase cristalina é um fator extremamente importante na formação de emulsões finamente divididas (MORALES *et al.*, 2003).

### *3- OBJETIVOS*

---

---

### 3 – OBJETIVOS

O objetivo geral da pesquisa foi desenvolver nanoemulsões O/A, utilizando como fase oleosa óleos vegetais diversos com atividade antioxidante, avaliar a eficácia fotoprotetora dessas emulsões contendo metoxicinamato de octila, determinar a atividade antioxidante dos óleos e emulsões, realizar estudos de retenção e permeação *in vitro* e avaliar o potencial irritante das nanoemulsões, utilizando o ensaio em membrana corioalantóide de galinha (HET- CAM).

#### 3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos a serem estudados através do teste de redução do radical DPPH•;
- Desenvolver e caracterizar físico – quimicamente as nanoemulsões estáveis, aditivadas ou não de metoxicinamato de octila;
- Analisar a influência de variações qualitativas e quantitativas no processo/método de emulsificação;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade das nanoemulsões obtidas;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* das nanoemulsões obtidas, através do teste de redução do radical DPPH•;
- Determinar o Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* das nanoemulsões obtidas;
- Realizar estudos preliminares de retenção e permeação *in vitro*;
- Avaliar o potencial irritante das nanoemulsões e dos tensoativos em modelo organotípico, utilizando o ensaio em membrana corioalantóide de galinha (HET- CAM).

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – MATERIAL

#### 4.1.1 – FASE OLEOSA:

- óleo de oliva extra virgem (Aboissa do Brasil)- INCI name: *Olive oil*
- óleo de semente de uva (Lipo do Brasil)- INCI name: *Vitis vinifera oil*
- óleo de açáí (Beraca Sabará)- INCI name: *Euterpe oleracea pulp oil*

**Tabela 3** – Especificações do óleo de oliva conforme fornecedor (Aboissa).

Características	Especificações
Aparência (Temperatura ambiente)	Líquido viscoso
Cor	Verde claro
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,921 g/cm <sup>3</sup>
Índice de Refração	1,465
Índice de Iodo	100,5 gI <sub>2</sub> / 100g
Índice de Saponificação	170,0 mgMgKOH/ g
Índice de acidez (ácido oléico)	0,1%
Índice de Peróxido	2,5meq/1000g

**Tabela 4** – Especificações do óleo de semente de uva conforme fornecedor (Lipo do Brasil).

Características	Especificações
Aparência (Temperatura ambiente)	Líquido viscoso
Cor	Amarelo muito claro
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,911 g/cm <sup>3</sup>
Índice de Refração	1,452
Índice de Iodo	102,5 gI <sub>2</sub> / 100g
Índice de Saponificação	172,0 mgMgKOH/ g
Índice de acidez (ácido oléico)	0,15%
Índice de Peróxido	2,2meq/1000g

**Tabela 5** – Especificações do óleo de açáí conforme fornecedor (Beraca Sabará).

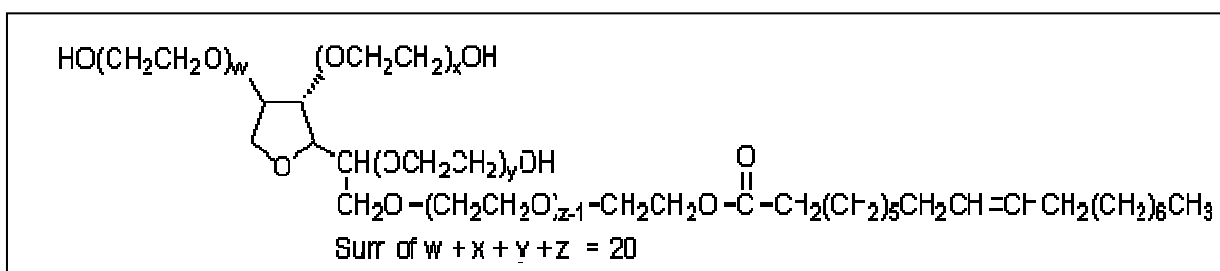
Características	Especificações
Aparência (Temperatura ambiente)	Líquido viscoso
Cor	Amarelo muito claro
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,910 g/cm <sup>3</sup>
Índice de Refração	1,471
Índice de Iodo	107,1 gI <sub>2</sub> / 100g
Índice de Saponificação	170,2 mgMgKOH/ g
Índice de acidez (ácido oléico)	0,20%
Índice de Peróxido	3,5meq/1000g

#### 4.1.2 – FASE AQUOSA:

- água recém destilada

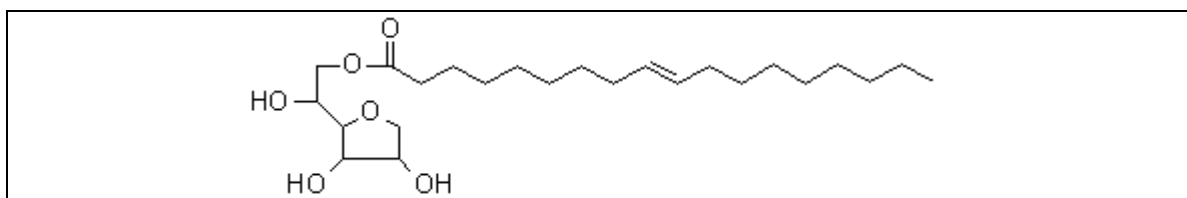
#### 4.1.3 – TENSOATIVOS:

- *Polissorbato 80* (Tween<sup>®</sup> 80)- INCI name: *Polysorbate 80* (**Figura 10**) - fabricante: Brenntag; valor de EHL: 15,0



**Figura 10** – Estrutura molecular do polissorbato 80  
([www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P8074](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P8074)).

- *Monooleato de Sorbitano* (Span<sup>®</sup>80)- INCI name: *Sorbitan oleate* (**Figura 11**) - fabricante: Brenntag; valor de EHL: 4,3



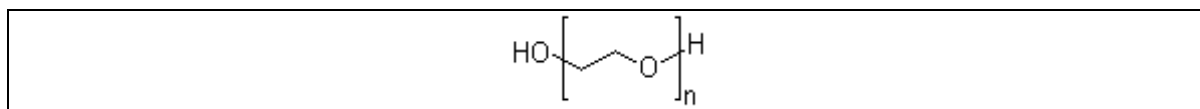
**Figura 11** – Estrutura molecular de monooleato de sorbitano  
([www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/S6760](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/S6760)).

- Óleo de rícino 15 OE (Ulтроil<sup>®</sup> R-150) - INCI name: *PEG- 15 castor oil* - fabricante: Brenntag; valor de EHL: 8,3

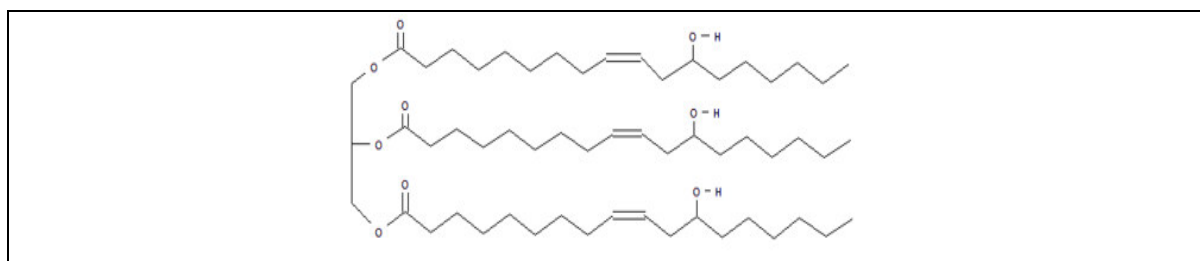
- Óleo de rícino 30 OE (Ulтроil<sup>®</sup> R-300) – INCI name: *PEG- 30 castor oil*- fabricante: Brenntag; valor de EHL: 11,7

A **Figura 12** representa a estrutura molecular do poli óxido de etileno e a **Figura 13** a estrutura molecular do óleo de rícino (a estrutura polimérica do Ulтроil R150<sup>®</sup> e Ulтроil R300<sup>®</sup>

não está disponível na literatura). O óleo de rícino etoxilado é um éster obtido pela reação de óxido de etileno com óleo de rícino não-hidrogenado



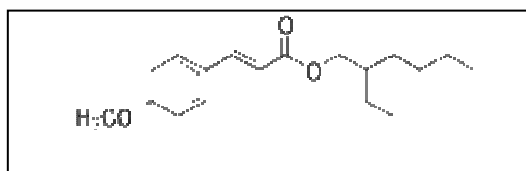
**Figura 12** – Estrutura molecular do óxido de etileno, para o Ultroil R150<sup>®</sup> e Ultroil R300<sup>®</sup> (MEYER, WAIDELICH & FRAHM, 2002; CROY & KWON, 2005).



**Figura 13** – Estrutura molecular do óleo de rícino (MEYER, WAIDELICH & FRAHM, 2002; CROY & KWON, 2005).

#### 4.1.4 – ATIVO:

- Metoxicinamato de octila (**Figura 14**)- INCI name: *2-Ethylhexyl-3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate* - fornecedor: Pharmaspecial, São Paulo.



**Figura 14** – Estrutura molecular do metoxicinamato de octila (en.wikipedia.org/wiki/Octyl\_methoxycinnamate).

**Tabela 6** – Especificações do metoxicinamato de octila conforme o fornecedor (Pharmaspecial).

Característica	Especificações
Pureza	101,6%
Índice de Refração (20°C)	1,544
Densidade (25°C)	1,008g/cm <sup>3</sup>
Índice de Acidez	0,19 mgKOH/g
Aparência	Líquido incolor a levemente amarelado
Índice de Saponificação	190,0

#### 4.1.5 – CONSERVANTE:

Como sistema conservante foi utilizado o Phenova<sup>®</sup> (Croda do Brasil) (INCI



name: “*Phenoxyethanol & Methylparaben & Ethylparaben & Butylparaben & Propylparaben & Isobutylparaben*”). Preservante microbiológico de amplo espectro para os mais diversos produtos tópicos. Amplamente empregado em cosméticos, incluindo formulações ricas em proteínas e tensoativos catiônicos, aniônicos e não iônicos, em concentrações que variam de 0,05 a 0,2%. Possui amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram positiva e Gram negativa, fungos e leveduras.

#### **4.1.6 – TESTE DE FPS *IN VITRO*:**

- álcool etílico absoluto – Fornecedor: Sigma
- formulação comercial FPS 15- Fabricante Nívea – Val: 10/2010

#### **4.1.7 – ENSAIO HET-CAM:**

Foram utilizados ovos fecundados de 10 dias procedentes de galinhas Leghorn. O NaOH (hidróxido de sódio) e o SDS (dodecil sulfato de sódio) foram fornecidos por Chemyunion.

#### **4.1.8 – PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*:**

- Fosfato de potássio monobásico-PA – Fornecedor: Sigma
- Hidróxido de sódio-PA – Fornecedor: Sigma
- Álcool etílico-PA – Fornecedor: Sigma
- Fita adesiva transparente – 3M
- Base auto-emulsionante Crodafos CES acid para a Macroemulsão controle – Croda do Brasil<sup>®</sup>

## 4.2 – MÉTODOS

### 4.2.1 – SCREENING DOS ÓLEOS ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH<sup>•</sup>

De acordo com SILVA; BORGES; FERREIRA (1999) e CAVIN *et al.*, (1998), a avaliação da capacidade antioxidante terá como base a redução do radical DPPH<sup>•</sup> através da medida da absorbância da solução alcoólica de DPPH<sup>•</sup> por espectrofotometria no UV/Vis.

A solução de DPPH<sup>•</sup> foi preparada minutos antes do ensaio a 250 µM em etanol absoluto, e armazenada sob refrigeração (BLOIS, 1958). Em tubos de ensaio foram adicionados: 1mL de tampão acetato de sódio (100mM) pH 5,5; 1 mL de álcool etílico 95%, diferentes volumes de óleo para a obtenção de concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2 mgml<sup>-1</sup> para um volume final de 100 µL completados com etanol e 500 µL de solução alcoólica DPPH<sup>•</sup>, deixadas reagir em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. As mesmas soluções amostra sem reagir com DPPH<sup>•</sup> constituíram o branco da reação.

Após os 15 minutos, mediu-se a absorbância das soluções a 517 nm, no espectrofotômetro de UV/Vis da marca Shimadzu, modelo UV- 1601 PC. Todas as etapas foram feitas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi calculada utilizando a fórmula no quadro abaixo (**Equação 2**).

CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle positivo}}$$

Para o controle positivo foi medida a absorbância da solução de DPPH<sup>•</sup>.

Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC<sub>50</sub>) foram calculados no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra de óleo e a ordenada é a média da AA% das 3 amostras de cada concentração.

Para este teste foram analisados os óleos de oliva, semente de uva, açaí e a mistura dos óleos de oliva e semente de uva na proporção de uma parte de óleo de oliva para três partes de óleo de semente de uva.

Este teste foi realizado com o intuito de quantificarmos a atividade antioxidante dos óleos, para posteriormente selecionar aqueles com melhor atividade antioxidante para constituir a fase oleosa dos sistemas a serem desenvolvidos.

## **4.2.2 – PREPARO DAS EMULSÕES**

### **4.2.2.1 – EMULSIFICAÇÃO POR INVERSÃO DE FASES DA EMULSÃO**

As emulsões foram preparadas aquecendo-se as fases aquosa e oleosa separadamente à temperatura de  $85\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa sob agitação (600 rpm) contínua até que as emulsões atingissem a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (GONÇALVES, 2000).

### **4.2.2.2 – DETERMINAÇÃO DO EHL REQUERIDO PARA OS ÓLEOS DE OLIVA E SEMENTE DE UVA**

A seleção do valor de EHL requerido foi realizada em duas etapas, para os óleos de oliva e de semente de uva. A etapa I foi realizada com um par de tensoativos, selecionando pontos a partir do valor 4,3 (tensoativo lipofílico/ monooleato de sorbitano / Span 80<sup>®</sup>) até o valor 15,0 (tensoativo hidrofílico/ polisorbato 80 / Tween 80<sup>®</sup>). A porcentagem total da mistura de tensoativos foi 5%, sendo a de óleo 10% e de água 85%. Na etapa II, foi realizado o estudo do EHL requerido pelos mesmos óleos com outro par de tensoativos (tensoativo lipofílico/ monooleato de sorbitano / Span 80<sup>®</sup>; hidrofílico/ PEG – 30 *Castor oil* / Ultroil<sup>®</sup> R300).

Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidro e lipofílico necessários para a obtenção de cada valor de EHL foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{EHL A} \times 0,01 \text{ A} + \text{EHL B} \times 0,01 \text{ B} = \text{EHL}$$

(Equação 3)

$$\text{A} + \text{B} = 100$$

A quantidade dos tensoativos hidrofílico e lipofílico para cada valor de EHL está apresentada na **tabela 7**.

**Tabela 7** – Concentração em % (p/p) de tensoativos lipofílico e hidrofílico utilizados na obtenção do EHL (Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo) requerido para os óleos de oliva e semente de uva.

<i>Valor de EHL</i>	<i>Monooleato de sorbitano/ Polissorbato 80</i>	<i>Monooleato de Sorbitano/ PEG – 30 Castor oil</i>		
4,3	5,00	-	-	-
5,0	4,67	0,33	-	-
6,0	4,21	0,79	-	-
7,0	3,74	1,26	1,82	3,18
8,0	3,27	1,73	2,50	2,50
9,0	2,80	2,20	3,18	1,82
10,0	2,34	2,66	-	-
11,0	1,87	3,13	-	-
12,0	1,40	3,60	-	-
13,0	0,93	4,07	-	-
14,0	0,47	4,53	-	-
15,0	-	5,00	-	-

#### 4.2.2.3 – DETERMINAÇÃO DO SISTEMA TENSOATIVO

Com o intuito de obter nanoemulsões à base de óleo de oliva e de semente de uva, foram testados diversos pares de tensoativos a fim de selecionar aquele que garante maior estabilidade ao sistema. Os pares de tensoativos foram utilizados na proporção para que atingissem o valor de EHL dos óleos de oliva e semente de uva previamente determinado

através do método descrito em 4.2.2.2. A composição das formulações está descrita na **tabela 8**.

**Tabela 8** – Denominação e composição % (p/p) das formulações manipuladas para determinação do sistema tensoativo.

Formulação	Oliva	Semente de Uva	PEG- 30 Castor oil	PEG- 15 Castor oil	Monooleato de sorbitano
1	-	10,0	5,0	-	5,0
2	10,0	-	5,0	-	5,0
3	2,5	7,5	5,0	-	5,0
4	-	10,0	-	9,25	0,75
5	10,0	-	-	9,25	0,75
6	2,5	7,5	-	9,25	0,75

#### 4.2.2.4 – OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES

O método de obtenção de emulsões através de diagrama ternário foi descrito por COMELLES *et al.*,(1989) e TREGUIER *et al.*, (1975). O diagrama ternário (**Figura 15**) é representado no plano como triângulo equilátero, onde a composição dos três constituintes é simétrica. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: óleo, água e tensoativo. O vértice superior representa 100% do óleo, o inferior direito representa 100% do tensoativo e o inferior esquerdo representa 100% da fase aquosa, conforme **tabela 9**.

O diagrama foi obtido inicialmente variando as concentrações de 10 em 10% (p/p), a fim de cobrir toda a superfície do triângulo, obtendo-se assim 36 formulações para cada sistema proposto.

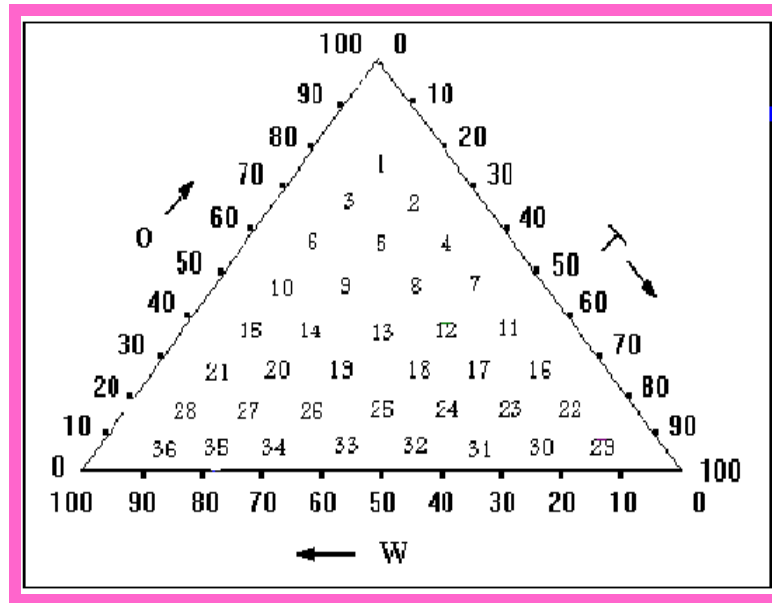


Figura 15 – Representação do diagrama ternário (ZANATTA, 2008).

Tabela 9 – Concentrações % (p/p) dos componentes da emulsão conforme diagrama ternário.

Número da Amostra	Óleo	Tensoativo	Água destilada
1	80	10	10
2	70	20	10
3	70	10	20
4	60	30	10
5	60	20	20
6	60	10	30
7	50	40	10
8	50	30	20
9	50	20	30
10	50	10	40
11	40	50	10
12	40	40	20
13	40	30	30
14	40	20	40
15	40	10	50

---

16	30	60	10
17	30	50	20
18	30	40	30
19	30	30	40
20	30	20	50
21	30	10	60
22	20	70	10
23	20	60	20
24	20	50	30
25	20	40	40
26	20	30	50
27	20	20	60
28	20	10	70
29	10	80	10
30	10	70	20
31	10	60	30
32	10	50	40
33	10	40	50
34	10	30	60
35	10	20	70
36	10	10	80

---

#### 4.2.2.5 – PREPARO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases, onde a fase aquosa, constituída de água recém destilada, e a oleosa, constituída de óleo e sistema tensoativo foram aquecidas separadamente a  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa sob agitação (agitador mecânico Fisaton-Mod. 713) contínua até que

atingissem a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), conforme metodologia desenvolvida por GONÇALVES (2000).

#### **4.2.2.6 – ADIÇÃO DO METOXICINAMATO DE OCTILA ÀS NANOEMULSÕES**

As nanoemulsões foram preparadas conforme 4.2.2.5. Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa contendo metoxicinamato de octila, sob agitação (agitador mecânico Fisaton-Mod. 713) contínua até que atingissem a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), conforme metodologia desenvolvida por GONÇALVES (2000).

#### **4.2.3 – TESTE DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES**

##### **4.2.3.1 – TESTE PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis após 24 horas da manipulação foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade. As amostras submetidas ao teste foram classificadas quanto a possíveis alterações macroscópicas em: **N** = normal; **LM** = levemente modificada; **M** = modificada e **IM** = intensamente modificada (FERRARI, 1998, 2002).

##### **4.2.3.1.1 – ESTRESSE TÉRMICO**

As amostras foram submetidas a aquecimento (banho-maria termostatizado) (Nova Técnica Ltda<sup>®</sup> – Modelo 281 NT) na faixa de temperatura de 40 a  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante ciclos de 30 minutos, com incrementos de temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  após cada ciclo. Após cada aumento de temperatura foi analisada a integridade das emulsões (IDSON, 1993a; IDSON, 1993b).



#### 4.2.3.1.2 – CENTRIFUGAÇÃO

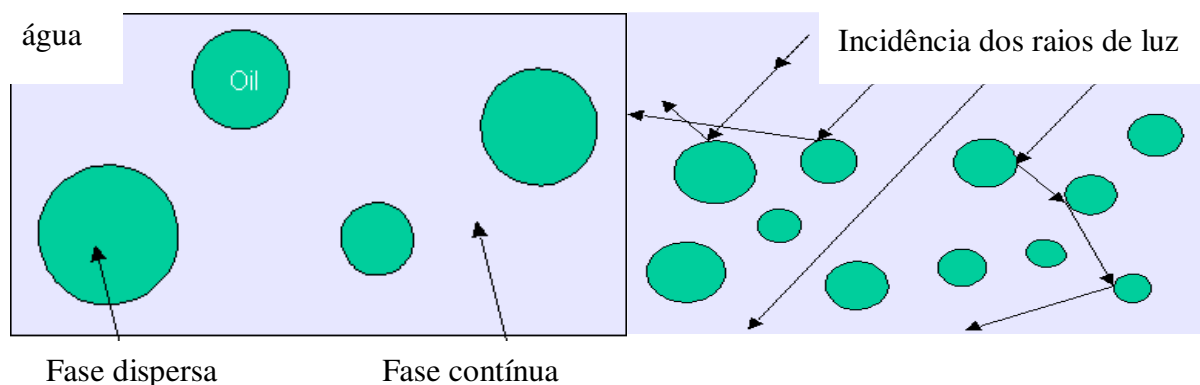
Em tubo de ensaio cônico graduado para centrífuga foram adicionadas amostras de cada formulação e submetidas a ciclos de 15 minutos de duração a 1000, 2500 e 3500 rpm (70, 440 e 863G, respectivamente) (Fanem<sup>®</sup> Ltda. – Modelo 206 R; Excelsa BABY II) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999; IDSON, 1993a; IDSON, 1993b).

#### 4.2.3.2 – TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

As amostras foram submetidas a diferentes temperaturas ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por um período de 30 dias. As leituras foram realizadas no 1º, 7º, 15º e 30º dia, após o preparo. As amostras foram avaliadas quanto as possíveis variações nos valores de pH e distribuição granulométrica (RIBEIRO; KHURY; GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998, 2002).

##### 4.2.3.2.1 – DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

A distribuição de tamanho das partículas é baseada em espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento quase-elástico de luz (**Figura 16**) que caracteriza o tamanho das partículas (granulometria) iluminando-as com laser. As amostras foram inicialmente diluídas em água destilada na proporção de 1:10 e aplicadas na cubeta do aparelho *counter* DELSA 440 SX<sup>®</sup> (Coulter Eletronics, MA, USA) com o auxílio de uma seringa hipodérmica adaptada (COULTER, 1988).



**Figura 16** – Esquema da espectroscopia de correlação de fóton ou espalhamento quase-elástico de luz, conforme aparelho Coulter DELSA 440XS, para caracterização do tamanho de glóbulo.

#### 4.2.3.2.2 – DETERMINAÇÃO DO VALOR DE pH

O peagômetro foi calibrado com as soluções tampão padrões e o valor do pH foi medido inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra em temperatura de  $25\pm 2$  °C. As amostras não foram diluídas (ANVISA, 2004).

### 4.2.4 – ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS SISTEMAS NANOEMULSIONADOS PROPOSTOS

#### 4.2.4.1 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

##### 4.2.4.1.1 – EMULSIFICAÇÃO À FRIO

O experimento de emulsificação a frio foi conduzido à temperatura ambiente ( $25\pm 2$ °C) monitorada e nenhuma das fases foi aquecida. A fase oleosa (óleo de oliva, semente de uva ou semente de uva/oliva) e o par de tensoativos foram homogeneizados, e posteriormente a fase aquosa, foi gotejada nesta mistura com o auxílio de uma bureta (velocidade de gotejamento não controlada). As concentrações das matérias-primas utilizadas não foram alteradas. A formulação foi obtida sob agitação contínua e constante de 600 rpm (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

#### 4.2.4.1.2 – EMULSIFICAÇÃO COM AQUECIMENTO DE FASES

As fases, aquosa e oleosa, foram aquecidas separadamente à temperatura de  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa sob agitação constante e contínua, à velocidade de 600 rpm até que a emulsão atingisse a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, manipulou-se novamente as emulsões, onde as fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à temperatura de  $75\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa sob agitação constante e contínua, a velocidade de 600 rpm até que a emulsão atingisse a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.2.4.2 – INFLUÊNCIA DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS COMPONENTES

Foram avaliados quatro métodos de preparo (FORGIANINI *et al.*, 2001):

- A - Fase aquosa vertida sobre a fase oleosa adicionada de tensoativos;
- B - Fase aquosa adicionada de tensoativos vertida sobre a fase oleosa;
- C - Fase aquosa adicionada de tensoativo hidrofílico vertida sobre fase oleosa adicionada de tensoativo lipofílico;
- D - Fase aquosa, fase oleosa e tensoativos aquecidos conjuntamente.

A temperatura de aquecimento das fases foi de  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$  e a agitação 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton- Mod.713). Foram avaliadas as características macroscópicas, microscópicas e distribuição granulométrica, após 24 horas do preparo.

#### 4.2.4.3 – INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

As emulsões foram preparadas conforme 4.2.2.5. Em seguida verteu-se lentamente a fase aquosa sobre a oleosa e submetidas a três diferentes velocidades de agitação: manual, 600 rpm (Agitador Mecânico Fisaton-Mod.713) e 13.000 rpm (Ultra Turrax) (FERNADEZ *et al.*, 2004), mantendo-as sob agitação (agitador mecânico Fisaton-Mod. 713) até que atingissem a

temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), conforme metodologia desenvolvida por GONÇALVES (2000) (FERNANDEZ *et al.*, 2004). As amostras submetidas à velocidade de 13000 rpm foram mantidas sob essa velocidade por 1 minuto e posteriormente foram colocadas sob agitação a 150 rpm, até atingir a temperatura ambiente. Após 24 horas do preparo, as emulsões foram submetidas à análise macroscópica e determinação da distribuição granulométrica.

#### **4.2.5 – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INVERSÃO DE FASES ATRAVÉS DA MEDIDA DA CONDUTIVIDADE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (INVERSION POINT)**

A temperatura de inversão de fases das nanoemulsões selecionadas foi determinada com auxílio de um condutivímetro (DIGIMED® Modelo CD- 20) com aquecimento da amostra em chapa metálica sob temperatura controlada com auxílio de um termômetro. As leituras foram feitas a partir da temperatura ambiente  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e a cada incremento de  $5^\circ\text{C}$ , até  $90^\circ\text{C}$ .

As formulações foram preparadas com solução de NaCl  $10^{-2}$  M para facilitar a observação do ponto de inversão de fases, sendo que nesta concentração os eletrólitos não causam interferência no processo de emulsificação e inversão de fases (IZQUIERDO *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2001; TADROS, 2004).

Foi determinada a temperatura na qual ocorreu diminuição brusca no valor de condutividade, evidenciando a inversão da emulsão de O/A para A/O (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

#### **4.2.6 – DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

Amostras de nanoemulsão contendo 7,5g de metoxicinamato de octila foram preparadas e diluídas em álcool etílico absoluto PA. na concentração final de  $0,2\mu\text{L}/\text{mL}$  para a leitura no espectrofotômetro. As leituras foram realizadas na faixa de 290 a 320 nm com intervalos de 5 nm, conforme o método descrito por MANSUR (1984), (Equação 4). Os

resultados foram calculados pelos valores originais e expressos como a média de todos os valores.

(Equação 4)

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)$$

FC = fator de correção (=10)

EE ( $\lambda$ ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ )

I ( $\lambda$ ) = intensidade do sol no comprimento de onda ( $\lambda$ )

abs ( $\lambda$ ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda ( $\lambda$ )

As constantes EE e I foram pré-definidas por MANSUR (1984), conforme **tabela 10**. A análise foi realizada em espectrofotômetro de UV/Vis da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC.

**Tabela 10** – Constantes EE e I pré- definidas por MANSUR para o cálculo de FPS *in vitro*.

$\lambda$ (nm)	EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
$\Sigma$	1,0000

**Legenda:** EE ( $\lambda$ ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ ), I ( $\lambda$ ) = intensidade do sol no comprimento de onda ( $\lambda$ ),  $\lambda$  = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ).

#### 4.2.7 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS EMULSÕES

Para a análise da atividade antioxidante das emulsões utilizou-se o mesmo método descrito no item 4.2.1. Neste ensaio as emulsões foram manipuladas por dois métodos diferentes: método de emulsificação a frio (4.2.4.1.1), método de preparo com o aquecimento das fases (4.2.2.5). Esta análise também foi realizada para os óleos puros, na mesma proporção das emulsões e para uma solução micelar de tensoativo, que foi preparada através do aquecimento das fases aquosa e sistema tensoativo separadamente e vertido um sobre o outro com agitação até completo resfriamento.

#### 4.2.8 – ESTUDO PRELIMINAR *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO METOXICINAMATO DE OCTILA

##### 4.2.8.1 – PREPARAÇÃO DA MACROEMULSÃO – CONTROLE

A macroemulsão foi preparada conforme item 4.2.2.5. A formulação da macroemulsão foi feita conforme **tabela 11**.

**Tabela 11** – Composição % (p/p) da macroemulsão utilizada para o teste preliminar de permeação e retenção cutânea *in vitro*.

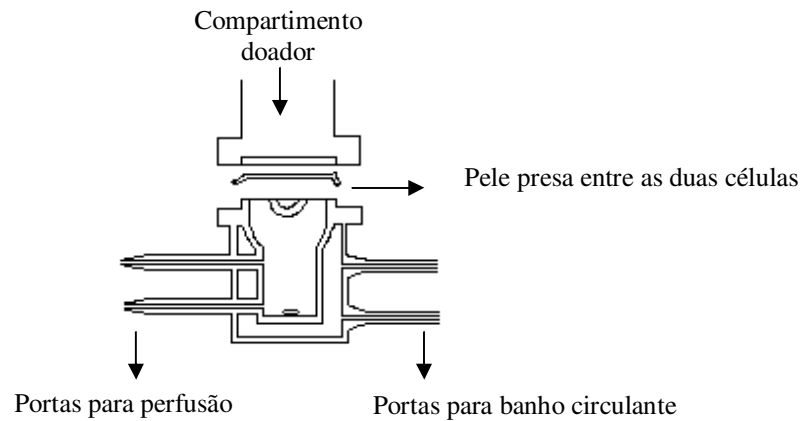
	Base auto – emulsionante (%)	Semente de uva (%)	Água (%)	Metoxicinamato de octila (%)
1	10	10	72,5	7,5

##### 4.2.8.2 – OBTENÇÃO DA PELE

A pele da orelha de porco foi utilizada como modelo nos estudos preliminares de permeação/retenção *in vitro*. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente sacrificados foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente com bisturi. Estas foram dermatomizadas (700 µm) e então congeladas por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios (LOPEZ *et al.*, 2001, LOPEZ *et al.*, 2004).

#### 4.2.8.3 – ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

Foram realizados experimentos de permeação *in vitro* ( $n = 3$ ) com peles da região dorsal de orelhas de porcos, empregando metodologias e célula de difusão vertical tipo “Franz” (**Figura 17**).



**Figura 17** – Célula de difusão tipo “Franz” (LOPEZ *et al.*, 2001, LOPEZ *et al.*, 2004).

A pele de orelha de porco foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme em contato com a solução receptora, constituída de tampão fosfato isotônico pH, 7,4 (0,1M).

300 mg de nanoemulsão contendo metoxicinamato de octila foram colocados sobre toda a área ( $0,78 \text{ cm}^2$ ) da pele, evitando-se a formação de bolhas entre a preparação e a pele. Os experimentos foram conduzidos a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm por meio de agitador magnético.

Devido à solubilidade do OMC ser muito baixa em tampão fosfato, foram feitas a coletas da solução receptora em tempos pré-determinados de 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas, as soluções receptoras foram coletadas para quantificação do conteúdo de metoxicinamato de octila permeado por espectrofotometria no comprimento de onda de 311nm. A cada volume retirado da solução receptora, quantidades iguais de solução receptora era recolocado, para que o experimento pudesse prosseguir e garantir a *sink condition* da pesquisa.

Foram feitas varreduras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 200 à 350nm, de um extrato etanólico de pele e de um extrato etanólico de fita adesiva sem o ativo,

---

a fim de verificar que não ocorria absorção no mesmo comprimento de onda do OMC (311nm).

Para os estudos de retenção foram conduzidos experimentos durante 12 horas. Após este tempo, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente foi delicadamente removido com auxílio de água destilada. Posteriormente, secas com papel absorvente. As peles foram então fixadas em uma superfície lisa com o EC voltado para cima, presas com alfinetes e cobertas por fitas brancas adesivas, deixando exposta apenas a área de permeação. Foram aplicadas sucessivas fitas adesivas (12 fitas) até total remoção do estrato córneo, indicado pelo brilho na face exposta da pele, ou seja, atingiu-se a epiderme viável (LOPEZ *et al.*, 2001, LOPEZ *et al.*, 2004).

As fitas foram unidas e colocadas em tubos de extração contendo 4,0 mL de álcool etílico absoluto e agitadas em ultra turrax por 1 minuto. Posteriormente, foram deixadas por 30 minutos em banho ultra-som e filtradas em membranas poro 0,4  $\mu\text{m}$  (Millipore®). A concentração do filtro solar foi quantificada no filtrado por espectrofotometria.

O tecido cutâneo restante foi colocado em tubos de extração, triturado e agitado em mixer por 1 minuto contendo 4,0 mL de álcool etílico absoluto. Após, este foi sonicado durante 30 segundos e em seguida, foi deixado por 30 minutos em banho de ultra-som para rompimento das células. A mistura de tecido cutâneo e álcool foi filtrada em membranas poro 0,4  $\mu\text{m}$  (Millipore®). A concentração do filtro solar foi quantificada no filtrado por espectrofotometria (LOPEZ *et al.*, 2001, LOPEZ *et al.*, 2004).

O meio receptor foi escolhido conforme estudos de MARTY *et al.*, 2004, usado anteriormente em testes como o mesmo ativo.



#### 4.2.9 – ENSAIO DE IRRITAÇÃO EM MODELO ORGANOTÍPICO – HET - CAM

A membrana corioalantóide (CAM) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião do frango para as trocas gasosas através da casca de ovo. Suas características estruturais fazem com que sejam considerados similares a tecidos altamente vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes.

O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por LUEPKE (1985), aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA, na avaliação da segurança de diferentes tipos de produtos cosméticos e farmacêuticos (VINARDELL; GARCÍA, 2000; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL; MITJANS 2006). É um método estimativo de irritação de mucosas, principalmente ocular.

##### 4.2.9.1 – PREPARAÇÃO DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE

Os ovos foram cuidadosamente colocados em posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima. Com o auxílio de tesouras planas foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente com tesouras curvas, e posteriormente foi retirada a primeira membrana de aspecto esbranquiçado para deixar descoberta a membrana corioalantóide. Esta membrana é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos evidentes.

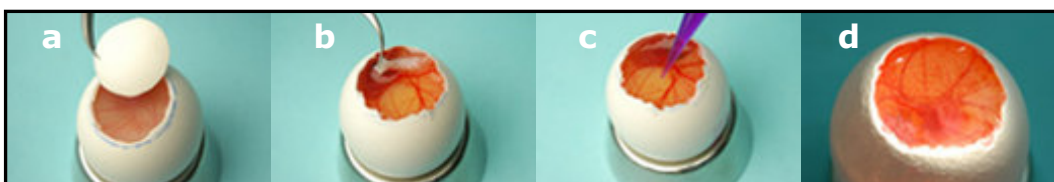
A seguir, as membranas foram avaliadas com finalidade de verificar danos, o que causaria a rejeição do ovo no experimento. Também são descartados os ovos em que não haja embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade) (VINARDELL; GARCÍA, 2000; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL; MITJANS 2006).

#### 4.2.9.2 – APLICAÇÃO DA AMOSTRA

No caso de amostras líquidas foram aplicados 0,3 mL com auxílio de uma micropipeta diretamente sobre a membrana corioalantóide. Para as amostras cremosas foram pesados 0,3 g foram depositados previamente em um pedaço de Parafilm, para favorecer posteriormente a retirada do produto, e aplicado sobre a membrana.

Os produtos permaneceram em contato com a membrana durante 20 segundos, após o período de contato, a membrana foi lavada para retirar o produto e realizada a avaliação da membrana corioalantóide (**Figura 18**).

Os tensoativos foram testados a uma concentração de 10,0% enquanto que as emulsões foram aplicadas diretamente às membranas sem diluições.



**Figura 18** – Preparação da membrana, primeiro se recorta a casca do ovo (a) e se elimina uma primeira membrana esbranquiçada (b) para expor a CAM. A seguir foram aplicados os produtos (c) e se avaliam os fenômenos de forma visual (d) (Imagens obtidas de [http://www.schrader-institute.de/htm/creachem\\_tox\\_ver.htm](http://www.schrader-institute.de/htm/creachem_tox_ver.htm)).

#### 4.2.9.3 – CONTROLES POSITIVOS

Como controles positivos, os ovos foram tratados com SDS (1%) e com NaOH (0,1 N) como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e coagulação).

#### 4.2.9.4 – OBSERVAÇÃO DA MEMBRANA

Após a aplicação do produto, a membrana foi observada durante 5 minutos e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sintomas de irritação, ou seja, hiperemia, hemorragia e/ou coagulação.

Foram avaliados os seguintes critérios:

**Hiperemia:** se observa o aparecimento de capilares que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis se observam mais vermelhos e intensos.

**Hemorragia:** anotar o tempo necessário para a ocorrência da hemorragia, a qual é observada por uma clara difusão de sangue no meio.

**Coagulação:** é detectada pela agregação de plaquetas que forma uma espécie de mancha rosada ou a coagulação de proteínas dando um aspecto de grumos esbranquiçados. É possível também observar um fenômeno de opacidade total ou parcial da membrana (VINARDELL; GARCÍA, 2000; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL; MITJANS 2006).

#### 4.2.9.5- AVALIAÇÃO DAS LESÕES

Foi dada uma pontuação em função do tempo (T) de aparição das diferentes lesões, segundo descrito na **tabela 12**.

Foram utilizados quatro ovos para avaliar cada produto, sendo que as pontuações de cada fenômeno, observada para cada ovo, foram utilizadas para o cálculo da média aritmética. A partir deste valor foi determinada a categoria em que se encaixa o produto segundo a classificação indicada na **tabela 13**.

**Tabela 12** – Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo.

Fenômenos	Tempo		
	T ≤ 30 s	30 s ≥ T ≤ 2 min	2 min ≥ T ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

**Tabela 13** – Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos (n=3).

Índice HET-CAM	Categorias
N < 1	Praticamente não irritante
1 ≤ N ≤ 5	Ligeiramente irritante
5 ≤ N ≤ 9	Moderadamente irritante
N ≥ 9	Irritante

N= número de pontos

#### **4.2.10- ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Para avaliar se houve diferença significativa entre os resultados dos ensaios de estabilidade das emulsões, fotoproteção *in vitro*, análise da capacidade antioxidante das emulsões e dos testes preliminares de retenção e permeação *in vitro* foi realizada a análise de variância dos valores obtidos para as duplicatas, em nível de significância de 95% (Software SigmaStat 3.5)

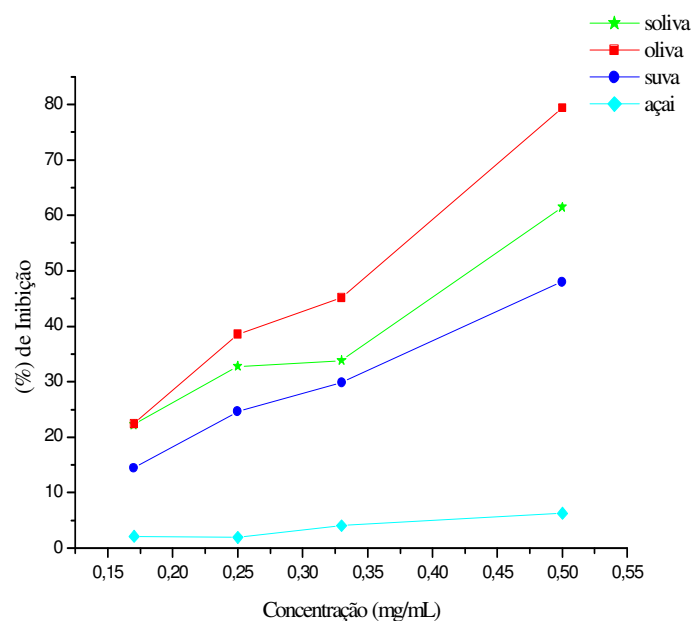
## 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – ESTUDO DA FASE OLEOSA

#### 5.1.1 – SCREENING DOS ÓLEOS ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH<sup>•</sup>

Os resultados apresentados na **Figura 19** demonstraram que os óleos analisados possuem atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH<sup>•</sup>. O óleo de oliva apresentou IC<sub>50</sub> de 0,34 mg/mL, sendo o óleo com maior atividade antioxidante dentre os analisados. O óleo de semente de uva apresentou IC<sub>50</sub> de 0,52 mg/mL, devido à presença de alfa-tocoferol e de bioflavonóides que atuam como interceptores dos radicais livres assim como as vitaminas C, E e beta caroteno (MORETTO; FETT, 1998). A mistura dos óleos apresentou IC<sub>50</sub> de 0,42mg/mL e o óleo de açaí foi o que demonstrou menor atividade antioxidante sendo a IC<sub>50</sub> de 3,65 mg/mL, provavelmente porque o potencial anti-oxidante do açaí esteja relacionado com o alto teor de antocianinas presentes na fruta (DE ROSSO *et al.*, 2008). Compostos estes que são hidrossolúveis (ZANATTA *et al.*, 2004), e não estariam presentes no óleo em quantidades significativas para promover esse tipo de atividade.



**Figura 19** – Gráfico da atividade redutora do radical DPPH<sup>•</sup>, para screening de óleos vegetais. LEGENDA: soliva= óleo de semente de uva + óleo de oliva (1:3); oliva= óleo de oliva; Suva= óleo de semente de uva; açaí= óleo de açaí.

O DPPH• é um radical estável que, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina (MORETTO; FETT, 1998).

Essa redução é acompanhada pela diminuição da absorbância em comprimentos de onda entre 517 e 520 nm, uma vez que ocorre uma mudança de coloração, de violeta (característica do radical) para amarela enquanto a reação se processa. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (HIRATA, 2004).

É sempre válido lembrar que este teste não é efetivo para todas as variações de antioxidantes existentes, pois segundo SANCHÈS *et al.*, (2007) que utilizaram vários métodos de análises para determinar a atividade antioxidante de compostos fenólicos dos óleos de oliva virgem e extra virgem, concluíram que embora eficiente o método de DPPH•, o melhor método e o mais reprodutível seria o método ABTS• e que a composição de antioxidantes varia em até 50% de óleos virgem para os óleos extra virgem de oliva, sendo os óleos extra virgem os que possuem maior atividade antioxidante, devido ao seu método de extração.

Segundo KALOGEROPOULOS *et al.*, (2006), que compararam vários testes para a determinação da atividade antioxidante de óleos vegetais, o teste de DPPH• foi um dos mais eficientes, pois retrata fielmente a atividade antioxidante dos mesmos, o que foi comprovado quando o mesmo teste foi usado para a escolha de nossa fase oleosa.

O óleo de oliva é considerado por muitos pesquisadores como um dos óleos vegetais mais estáveis contra processos de instabilidade, devido à sua alta concentração de compostos antioxidantes. Além da alta estabilidade, esses óleos são extremamente benéficos para a saúde, pois previnem inúmeras doenças. O óleo de oliva possui também a maior porcentagem de ácido oléico, que pode variar entre 65 – 75%, baixa concentração de gorduras saturadas.

Os compostos antioxidante predominantes no óleo de oliva são os compostos fenólicos, que ultimamente vem ganhando atenção devido ao seu benefícios em prevenir as doenças cardiovasculares, câncer, entre inúmeras outras associadas ao estresse oxidativo (BACCOURI *et al.*, 2007; CONDE; DERLOT; GERÓS, 2008)

BAIL *et al.*,(2007) investigaram a atividade antioxidante de óleos de semente de uvas pretas e brancas e contataram que o óleo de semente de uva preta tem potencial antioxidante maior, pois possuem uma maior quantidade de compostos voláteis e de compostos fenólicos. Além disso, as uvas pretas são preferidas para o consumo, pois os consumidores associam a sua cor aos benefícios. Os autores também concluíram que independente das condições de produção dessas uvas e até mesmo de extração desses óleos, a composição de ácidos graxos é a mesma, não havendo variações significativas (BAIL *et al.*, 2007).

Estudos realizados em extrações de vitamina E em óleo de diferentes variedades de sementes de uva, demonstraram uma variação enorme, sendo de 25mg de vitamina E/100g de óleo nas variedades Isabel e Concord e de 1 à 6 para a variedade Merlot. (BASILE, 1986; OOMAH *et al.*, 1998).

Encontram-se nas sementes de uvas, compostos fenólicos como as proantocianidinas, também conhecidas como taninos. Esses compostos apresentam como principais atividades farmacológicas a ação antimicrobiana, a prevenção do estresse oxidativo, o combate aos radicais livres, efeitos antitumoral, entre outros (FREITAS, 2007).

YU; ZHOU; PARRY (2004) aplicaram o teste de DPPH• para analisarem amostras de óleos de semente de cenoura, oxicoco (cranberry), cominho escuro e cânhamo e concluíram que embora o teste de DPPH• seja um teste usado para estimar a atividade antioxidante, o mesmo foi bastante válido, pois quando aplicado outros testes para avaliar as mesmas amostras, os resultados foram bastante semelhantes.



COSTA (2007) analisou pelo mesmo método o óleo de urucum e também os padrões rutina e tocoferol e teve resultados bastante relevantes, que posteriormente foram confirmados por outros testes.

Conforme NASCIMENTO *et al.*, (2008), o óleo de açaí possui 60 e 14% de ácidos graxos mono e poliinsaturados respectivamente, porém sua atividade antioxidante se concentra na polpa da fruta que mesmo sendo bastante gordurosa é difícil a extração do óleo com propriedades antioxidante significativas. Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do açaí são as antocianinas, compostos estes responsáveis pela cor escura e tinta da fruta, porém estes compostos são hidrossolúveis e não se encontram no óleo, não sendo possível o seu uso antioxidante.

Após a realização deste teste, optou-se pelos óleos de oliva, semente de uva e a mistura dos dois para formar a fase oleosa dos sistemas que foram desenvolvidos, já que estes apresentaram melhor atividade antioxidante e por possuírem inúmeros benefícios que foram de encontro com os interesses da pesquisa.

## **5.2 – PREPARO DAS EMULSÕES**

### **5.2.1 – DETERMINAÇÃO DO EHL REQUERIDO PARA OS ÓLEOS DE OLIVA E SEMENTE DE UVA**

A etapa I foi realizada com o par de tensoativos Tween 80<sup>®</sup>/ Span80<sup>®</sup> do estudo do EHL requerido dos óleos de oliva e semente de uva mostrou que as emulsões não eram estáveis havendo separação de fases após 24 horas da manipulação com os seguintes valores de EHL 5,0; 6,0; 10,0; 11,0; 12,0; 13,0; 14,0; 15,0, já as emulsões com valores 7,0; 8,0 e 9,0 apresentavam leve cremeação. Dessa forma, foi necessária a realização da etapa II, com o par de tensoativos Ultroil R300<sup>®</sup>/ Span 80<sup>®</sup>, a fim de investigar detalhadamente a faixa de valores de EHL entre 7,0 e 9,0. Portanto, um novo teste foi realizado, usando o novo par de

tensoativo, demonstrando que as emulsões que se mantinham estáveis após 24hs eram as que possuíam valor de EHL de 8,0. Isso condiz com os resultados obtidos por SANTOS (2006), que determinou o EHL de vários óleos vegetais e constatou que a maioria deles tem EHL entre 7,0 e 9,0.

De acordo com CHANAMAI; HORN; MCCLEMENTS (2002), a estabilidade de uma emulsão frente à cremeação depende da composição do óleo, pois a densidade da gotícula de óleo depende do tipo e da concentração de moléculas apolares presentes na fase interna. Além disso, a taxa de transporte destas moléculas apolares através do filme interfacial para fase aquosa depende de sua solubilidade em água e, em função disso, o crescimento das gotículas por Oswald ripening também será dependente da composição do óleo.

Para a preparação de emulsão estável do tipo O/A, deve-se considerar o EHL e a solubilidade da cadeia lipídica do emulsificante na fase oleosa (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O valor de EHL necessário para emulsificar um óleo pode ser determinado por preparação de emulsões com emulsificantes de vários valores de EHL, e determinar qual valor de EHL produz a emulsão mais estável (BECHER, 2001; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Nesse caso, ficou estabelecido através dos experimentos realizados que o EHL ótimo para os óleos de oliva e semente de uva seria o EHL de valor 8,0.

### **5.2.2 – DETERMINAÇÃO DO SISTEMA TENSOATIVO**

Segundo os resultados obtidos, o par de tensoativos constituído por *PEG-30 castor oil* (Ulтроil R300<sup>®</sup>) e monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) foi o que proporcionou maior estabilidade frente aos testes preliminares de estabilidade, o que sugere que a mistura de tensoativos no valor de EHL requerido pelos óleos, tanto de oliva quanto de semente de uva e a mistura dos dois, favorece a formação de emulsões estáveis no valor de EHL de 8.

A análise macroscópica mostrou ausência de instabilidade física no sistema, bem como a presença de características típicas de nanoemulsões, como translucência e reflexo azulado.

Na análise microscópica observou-se a morfologia, homogeneidade da amostra e presença de movimento browniano. Os resultados da análise da estabilidade preliminar das formulações estão descritos na **tabela 14**. As formulações foram preparadas como descrito na **tabela 8**.

**Tabela 14** – Análise macroscópica e microscópica das formulações com os óleos de oliva, semente de uva e a mistura dos dois.

Formu lação	Análise Macroscópica			Análise Microscópica		
	Reflexo azulado	Cremeação	Translucente/ Leitosa	Aspecto (fluidez)	Movimento Browniano	Floculação
1	-	-	L	+++	-	-
2	-	-	L	+++	-	-
3	+	-	L	+++	+	-
4	-	+	L	+	+	-
5	-	+	L	+	+	++
6	-	+	L	+	+	+

Legenda: L = leitosa; + = intensidade baixa; ++ = intensidade média; +++ = intensidade alta; - = ausência da característica.

Segundo LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG (2001), emulsões O/A mais estáveis, são formadas com uma combinação de tensoativos lipofílico e hidrofílico, ainda que seja possível obter formulações estáveis utilizando um único emulsificante.

É aconselhável a mistura de um emulsificante de baixo valor EHL (lipofílico) com outro de alto valor EHL (hidrofílico) promovendo a formação de uma interface coesa, visto que cada tipo de emulsificante se adsorverá fortemente à fase correspondente (PINHO; STORPIRTIS, 1998; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992).

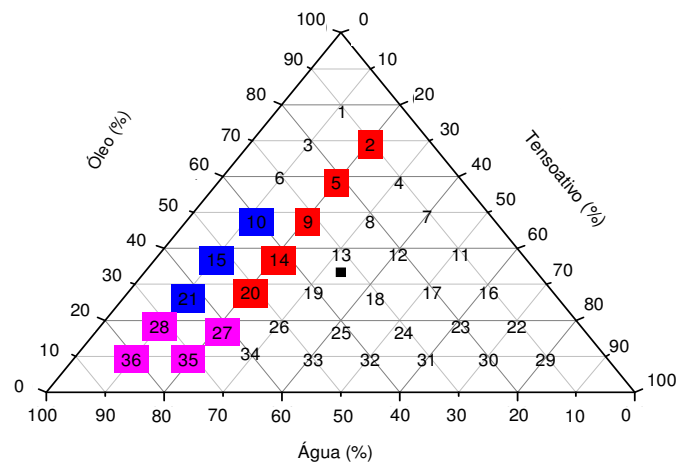
Estudos realizados por GULLAPALI; SHETH (1999) demonstram que a similaridade estrutural entre a mistura de emulsionantes e a fase dispersa é mais relevante que o valor de EHL para a obtenção de emulsões estáveis.

### 5.2.3 – OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES

De acordo com os resultados apresentados no item 5.2.2, o par de tensoativos selecionado para realização do diagrama ternário, a fim de encontrar a melhor composição das emulsões a serem estudadas, foi composto de: Monooleato de sorbitano associado ao PEG -30 *Castor oil*, no valor de EHL = 8,0. O sistema tensoativo Monooleato de sorbitano associado ao PEG -15 *Castor oil*, no valor de EHL = 8,0, não foi utilizado, por mostrar instabilidade nas emulsões desenvolvidas.

O resultado do estudo de diagrama de fases encontra-se descrito na **figura 20**. Os pontos 28, 27, 35 e 36 representam as emulsões estáveis, enquanto que os pontos 10, 15 e 21 são aquelas emulsões que apresentaram leve cremeação, já as emulsões 2, 5, 9, 14 e 20 apresentaram separação de fases, os demais pontos foram instáveis após 24 horas. As emulsões macroscopicamente estáveis foram submetidas à análise microscópica após 24 horas, revelando a formação de glóbulos bem pequenos. Contudo, a formulação de número 36 foi considerada a mais estável quando comparada às demais que apresentaram, macroscopicamente, menor translucência e microscopicamente glóbulos com tamanho e distribuição heterogêneos.

Após as análises a formulação 36 foi escolhida para a continuidade destes estudos.



**Figura 20** – Diagrama ternário, com as formulações manipuladas para a escolha da formulação. Emulsões 27, 28, 35 e 36: mais estáveis; emulsões 2, 5, 9, 14 e 20: separação total de fases; e as emulsões 10, 15 e 21: levemente cremeadas.

#### 5.2.4 – PREPARO DAS NANOEMULSÕES

Com a razão de óleo/água/tenssoativo de 10:80:10, as fases foram aquecidas a  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$  e emulsificadas sob agitação constante de 600 rpm. O resultado da análise após 24 horas demonstrou ser nanoemulsão pelo tamanho reduzido dos glóbulos, tendo as nanoemulsões, sem metoxicinamato de octila, tamanho de glóbulo  $\pm 100\text{nm}$ ; e as emulsões, com metoxicinamato de octila, tamanho de glóbulo  $\pm 180$  e com características de fluidez, reflexo azulado e translucência.

#### 5.2.5 – ADIÇÃO DO METOXICINAMATO DE OCTILA ÀS NANOEMULSÕES

Para a incorporação do metoxicinamato de octila na emulsão, usou-se o mesmo método descrito no item 5.2.4, sendo a razão óleo/água/tenssoativo/ativo de 10:72,5:10:7,5 e o metoxicinamato de octila foi adicionado à fase oleosa e aquecido junto à mesma.

As formulações foram designadas de acordo com o óleo usado para compor a fase oleosa. Portanto, Oliva corresponde ao óleo de oliva, Suva à semente de uva e Soliva à mistura dos dois óleos (semente de uva mais oliva).

As denominações A e B ao final de cada nomenclatura das emulsões são para diferenciá-las quanto à presença do metoxicinamato de octila, sendo A aquelas que não contêm filtro e B as que contêm filtro, na **Tabela 15**, encontram-se as formulações manipuladas.

**Tabela 15** – Formulações usadas no desenvolvimento da pesquisa, % (p/p).

Formulação	Oliva	Semente de uva	Sistema tensoativo	Metoxicinamato de octila	Água
<b>Oliva A</b>	10,0	-	10,0	-	80,0
<b>Oliva B</b>	10,0	-	10,0	7,5	72,5
<b>Suva A</b>	-	10,0	10,0	-	80,0
<b>Suva B</b>	-	10,0	10,0	7,5	72,5
<b>Soliva A</b>	2,5	7,5	10,0	-	80,0
<b>Soliva B</b>	2,5	7,5	10,0	7,5	72,5

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.

### 5.3 – TESTE DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES

#### 5.3.1 – TESTE PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

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

Após 24 horas da manipulação todas as formulações apresentaram as mesmas características macroscópicas: emulsão fluida, coloração branca à levemente amarelada com reflexo azulado, ausência de cremeação ou separação de fases.

As características macroscópicas das emulsões permaneceram inalteradas, após exposição à temperatura de  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante estresse térmico e ao final dos três ciclos de centrifugação, assim estas foram classificadas como N (normal, sem alteração) (FERRARI, 1998, 2000).

O estresse térmico permite o incremento da energia cinética do sistema, sendo possível avaliar a susceptibilidade do mesmo a este parâmetro (BECKER, 1965; BRACONI *et al.*, 1995; SCHICK, 1989).

Segundo TADROS; IZQUIERDO; ESQUENA (2004), o tamanho diminuto dos glóbulos da nanoemulsão causa grande redução na atuação da força da gravidade, e o movimento browniano pode ser suficiente para superá-la.

A centrifugação acelera a desestabilização do produto e simula seu período de validade. Segundo LATREILLE; PAQUIN (1990), se for assumido que a estabilidade é diretamente proporcional à força gravitacional, o comportamento em longo prazo das emulsões pode ser estimado pela centrifugação em velocidades moderadas. É aceito que a vida de prateleira em condições normais de estocagem possa ser rapidamente prevista pela observação da separação da fase dispersa devido à cremeação ou coalescência quando a emulsão é exposta à centrifugação, portanto de acordo com os resultados as emulsões apresentaram-se fisicamente estáveis conforme literatura (MASSON *et al.*, 2005).

Considerando que o tamanho de glóbulo das nanoemulsões em estudo se encontra entre 100 e 200 nm e que as emulsões são mais estáveis fisicamente, foram escolhidas as emulsões abaixo (**Tabela 16**) para estudo da estabilidade acelerada.

**Tabela 16** – Resultado do teste de estabilidade preliminar, análise macroscópica, estresse térmico e centrifugação.

Formulações	Estabilidade Preliminar			
	Macroscopia		Estresse Térmico	Centrifugação
	Aspecto	Coloração		
<b>Oliva A</b>	Fina, translúcida, reflexo azulado	Amarelo pálido	Sem alteração	Sem alteração
<b>Oliva B</b>	Fina, leitosa, reflexo azulado	Branco azulado	Sem alteração	Sem alteração
<b>Suva A</b>	Fina, translúcida, reflexo azulado	Branco azulado	Sem alteração	Sem alteração
<b>Suva B</b>	Fina, leitosa, reflexo azulado	Branco	Sem alteração	Sem alteração
<b>Soliva A</b>	Fina, translúcida, reflexo azulado	Amarelo pálido	Sem alteração	Sem alteração
<b>Soliva B</b>	Fina, leitosa, reflexo azulado	Branco azulado	Sem alteração	Sem alteração

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.

### 5.3.2 – TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

O tamanho dos glóbulos e a distribuição de tamanho podem afetar a floculação e a coalescência das emulsões (JEONG; OH; KIM, 2001). Geralmente quanto menor o tamanho dos glóbulos, mais estável será a emulsão. Os valores dos tamanhos de partículas apresentados na **tabela 17** foram obtidos através da média ponderada de 3 leituras. De acordo com os valores obtidos, foi concluído que todas as emulsões analisadas são nanoemulsões com granulometria pequena, o que lhes confere maior estabilidade.



**Tabela 17** – Determinação do tamanho de glóbulo (nm) e desvio padrão das nanoemulsões, durante o teste de estabilidade acelerada, por um período de 30 dias (n=3).

Condição	Formulação	24 hs	7 dias	15 dias	30 dias
T. ambiente (25±2°C)	Oliva A	131,0±19,782	115,25±17,84	100,0±6,06	69,00±20,80 <sup>a</sup>
	Oliva B	225,25±12,58	207,75±14,64	199,5±8,96	191,00±24,47
	Suva A	198,75±159,8	120,00±85,58	186,0±84,49	119,75±29,68
	Suva B	165,00±30,51	139,35±60,75	185,0±18,49	189,00±63,17
	Soliva A	116,75±9,25	86,00±17,57 <sup>a</sup>	86,25±95 <sup>a</sup>	76,5±4,51 <sup>a</sup>
	Soliva B	247,0±18,50	232,25±17,56	217,25±34,38	230,75±11,35
Geladeira (4±2°C)	Oliva A	131,0±19,782	122,25±41,7	102,75±12,74	134,5±66,20
	Oliva B	225,25±12,58	162,25±31,59	204,75±10,53	220,5±11,24 <sup>a</sup>
	Suva A	198,75±159,8	173,00±90,68	160,75±83,92	170,75±21,82
	Suva B	165,00±30,51	188,00±8,68	150,75±69,25	148,25±56,68
	Soliva A	116,75±9,25	143,25±60,67	149,25±55,10	206,75±65,67
	Soliva B	247,0±18,50	223,0±7,70	206,0±18,02	184,00±75,10
Estufa (45±2°C)	Oliva A	131,0±19,782	56,25±18,49	134,25±29,85	220,25±42,25
	Oliva B	225,25±12,58	204,75±13,89	219,25±10,79	204,50±24,68
	Suva A	198,75±159,8	118,5±36,38	231,00±61,96	278,25±97,38
	Suva B	165,00±30,51	191,25±72,40	137,25±41,87	301,25±26,2 <sup>a</sup>
	Soliva A	116,75±9,25	132,00±9,56 <sup>a</sup>	169,25±25,79	235,25±23,3 <sup>a</sup>
	Soliva B	247,0±18,50	235,50±14,01	240,75±17,17	216,25±2,217

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.

<sup>a</sup> = estatisticamente diferente em relação ao tempo 24hs.

**Temperatura ambiente:** Oliva B (P=0,060), Suva A (P=0,417), Suva B (P=0,613), Soliva B (P=0,349)

**Geladeira:** Oliva A (P=0,699), Suva A (P=0,958), Suva B (P=0,877), Soliva A (P=0,158), Soliva B (P=0,076)

**Estufa:** Oliva A (P= 0,235), Suva A (P=0,201), Soliva B (P=0,055)

Teste estatístico utilizado: ANOVA

MILLER; HENNING; GRÜNBEIN (2001) mostraram uma relação entre a concentração de tensoativo e o tamanho de glóbulo, ou seja, à medida que se aumenta o

---

primeiro observa-se uma diminuição do tamanho dos glóbulos, em função da diminuição da tensão interfacial.

O tamanho dos glóbulos de uma emulsão depende do método de emulsificação empregado. Os resultados obtidos sugerem a viabilidade do método de emulsificação por inversão de fases (EIF/ EPI) para o desenvolvimento destes sistemas e da demanda industrial atual por emulsões estáveis, obtidas através de métodos que consumam baixa energia, diminuindo assim o custo do processo (IZQUIERDO *et al.*, 2005; LIN; KURIHARA; OHTA, 1975; MARSZALL, 1987; SALAGER *et al.*, 2000; ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS, 2004; USÓN; GARCIA; SOLANS, 2004).

De acordo com os resultados da análise granulométrica, ocorreu aumento significativo no tamanho de glóbulo nas emulsões Oliva A ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /Temperatura ambiente), Soliva A ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /Temperatura ambiente), Oliva B ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ /geladeira), Suva B ( $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ /estufa) e Soliva A ( $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ /estufa). Isso ocorre, pois nas nanoemulsões o fenômeno de Ostwald Ripening provoca aumento no tamanho dos glóbulos, porém em nenhuma das formulações ocorreu separação total de fases e, além disso, o tamanho de glóbulo continuou dentro da faixa aceitável para nanoemulsão.

O valor de pH é um parâmetro de monitoramento da estabilidade em emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres reduzem o valor de pH das formulações, sendo empregados como indicadores de estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento (MARTINI, 2005).

PONTES (1989) determinou o teor de ácidos graxos do óleo extraído das sementes do maracujá e observou a predominância do insaturado linoléico (68,70%). SANT'ANNA

(2001) encontrou resultados semelhantes em diversos métodos cromatográficos. Sendo o óleo de semente de uva rico em ácido linoléico e o óleo de oliva rico em ácido oléico, e estes sendo ácidos graxos insaturados, é possível que tenha ocorrido processo de oxidação.

O processo oxidativo ocorre em cascata e, uma vez iniciado promove uma série de reações complexas envolvendo radicais livres que reagem com inúmeros compostos presentes na formulação provocando mudança na constituição química destes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Assim, a velocidade em que o processo oxidativo acontece deve ser retardada através da adição de um agente antioxidante para que não comprometa a estabilidade do produto final.

A comparação entre os valores de pH avaliados 24 horas após o preparo das emulsões e depois de submetê-las às condições de estresse apresentaram diferenças significativas (**Tabela 18**).

Os resultados mostraram que as amostras são estatisticamente diferentes para os valores de pH nos tempos analisados quando comparadas ao tempo 24 horas, isto sugere que processos de oxidação ou hidrólise catalisados pelo incremento da temperatura podem ter ocorrido, provavelmente iniciado por algum constituinte da fase oleosa.

No caso das emulsões estudadas, o óleo por ter atividade antioxidante comprovada retarda esse processo, mas não exclui a possibilidade de que um outro agente antioxidante deva ser adicionado à formulação para uma maior proteção frente à oxidação.

**Tabela 18** – Determinação dos valores de pH e desvio padrão das nanoemulsões durante o teste de estabilidade acelerada num período de 30 dias (n=3).

Condição	Formulação	24 hs	7 dias	15 dias	30 dias
↓	↓				
T. ambiente (25±2°C)	Oliva A	6,65±0,04	6,19±0,08	6,08±0,06	6,13±0,07
	Oliva B	6,60±0,01	6,24±0,09	6,09±0,04	6,20±0,01
	Suva A	6,26±0,06	5,88±0,03	5,83±0,02	5,85±0,31
	Suva B	6,55±0,04	5,63±0,07	5,55±0,04	5,58±0,05
	Soliva A	6,04±0,03	5,48±0,01	5,45±0,04	5,42±0,07
	Soliva B	6,15±0,05	6,75±0,07	6,63±0,03	6,71±0,09
Geladeira (4±2°C)	Oliva A	6,65±0,04	6,10±0,08	6,08±0,05	6,23±0,06
	Oliva B	6,60±0,01	6,25±0,10	6,10±0,03	6,21±0,01
	Suva A	6,26±0,06	5,77±0,01	5,86±0,02	5,90±0,03
	Suva B	6,55±0,04	5,65±0,06	5,57±0,03	5,56±0,05
	Soliva A	6,04±0,03	5,55±0,01	5,23±0,04	5,43±0,06
	Soliva B	6,15±0,05	6,68±0,09	6,62±0,03	6,77±0,09
Estufa (45±2°C)	Oliva A	6,65±0,04	6,12±0,08	6,09±0,05	6,33±0,06
	Oliva B	6,60±0,01	6,34±0,10	6,13±0,04	6,34±0,01
	Suva A	6,26±0,06	5,76±0,02	5,88±0,02	5,93±0,04
	Suva B	6,55±0,04	5,63±0,05	5,60±0,03	5,58±0,05
	Soliva A	6,04±0,03	5,55±0,01	5,43±0,04	5,44±0,07
	Soliva B	6,15±0,05	6,67±0,08	6,67±0,04	6,67±0,09

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila. Teste estatístico: Anova

#### 5.4 – ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS SISTEMAS NANOEMULSIONADOS PROPOSTOS

Algumas variáveis do processo, como a velocidade de agitação, a ordem de adição dos componentes e a temperatura, influenciam marcadamente as características físico-químicas finais da emulsão (LIN; KURIHARA; OTHA, 1975; BROOKS; RICHMOND; ZERFA, 1998; SIMOVIC *et al.*, 1999).

O processo de emulsificação é complexo e envolve inúmeros fenômenos que ocorrem

simultaneamente, como a formação da fase dispersa, adsorção dos agentes tensoativos e colisão dos glóbulos formados, o que pode ou não causar coalescência. Cada um destes processos ocorre inúmeras vezes durante a emulsificação, o que mostra que este processo é dinâmico e que estes acontecimentos podem ser extremamente importantes na formação de nano-glóbulos (TADROS, 2004).

#### 5.4.1 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

O método de emulsificação de baixa energia faz uso das propriedades físico-químicas do sistema para formar nanoemulsões, pois se aproveita da energia envolvida no processo de inversão de fases que ocorre durante a emulsificação (SOLANS *et al.*, 2005).

Há dois tipos de inversão de fases: a inversão Transicional induzida por fatores que afetam o EHL do sistema, como por exemplo, temperatura e/ou a concentração de eletrólitos; e a inversão Catastrófica, que é induzida pelo aumento da fração volumétrica da fase dispersa (BOUCHAMAL *et al.*, 2004; SAJJADI *et al.*, 2003; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003).

Inversão Catastrófica: este tipo de inversão é atribuído ao aumento da fração volumétrica da fase dispersa. De um modo geral a inversão catastrófica ocorre devido ao grande aumento na taxa de coalescência dos glóbulos de modo que o balanço entre a taxa de glóbulos coalescidos e glóbulos separados não pode ser mantida. A inversão catastrófica pode ser induzida pela adição da fase dispersa (SAJJADI, 2004) ou qualquer outro fator que possa aumentar a taxa de coalescência dos glóbulos (OLIVEIRA, 2008; SAJJADI, 2006; ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001, SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003; BOUCHAMAL *et al.*, 2004; SALAGER *et al.*, 2000, 2004; ROBERTS; XIE; BROOKS, 2006).

Inversão Transicional: ocorre quando a afinidade do tensoativo pela fase aquosa equilibra com a afinidade pela fase oleosa. A variação na afinidade ou o balanço Hidrofóbico-Lipofílico (EHL) do tensoativo pode ser conduzido pela alteração na temperatura (SHINODA

*et al.*, 1981), pela adição de um tensoativo com EHL diferente (SAJJADI, 2004), ou por adição de componentes que modificam o EHL do tensoativo como é o caso dos eletrólitos (OLIVEIRA, 2008; SALAGER, *et al.*, 2004, ZERFA; SAJJADI; BROOKS, 2001, SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003; BOUCHAMAL *et al.*, 2004; SALAGER *et al.*, 2000, 2004; ROBERTS; XIE; BROOKS, 2006).

Com o intuito de verificar por qual dos dois processos seriam obtidas as nanoemulsões ideais, os sistemas foram submetidos à emulsificação em três diferentes valores de temperatura ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ / Emulsificação a frio;  $75\pm 2^\circ\text{C}$  e  $85\pm 2^\circ\text{C}$ / Emulsificação a quente), a fim de avaliar a influência da mesma no processo de emulsificação, morfologia e tamanho dos glóbulos.

#### **5.4.1.1 – EMULSIFICAÇÃO À FRIO**

Após a manipulação, o aspecto macroscópico das emulsões era pouco translúcido e não apresentavam cremeação, com odor característico dos óleos. Na análise microscópica uma quantidade relevante de glóbulos pequenos foi observada e não apresentavam morfologia e distribuição granulométrica uniforme. Estes resultados vêm colaborar com a teoria de que o processo de temperatura de inversão de fases (inversão de fases transicional) não deve ser o único envolvido para a obtenção de glóbulos nanométricos para estes sistemas em análise.

Neste método, a sucessiva adição de água, faz com que ocorra primeiramente a formação de gotículas de água na fase contínua oleosa. Aumentando-se gradativamente a fração volumétrica da fase aquosa ocorre mudança espontânea na curvatura do tensoativo fazendo com que a emulsão inverta de A/O para O/A. Este processo é conhecido para sistemas no qual o tensoativo forma monocamadas flexíveis entre a interface água/ óleo formando uma microemulsão (fase bicontínua) ou fase líquido-cristalina no ponto da inversão (CAMARGO, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Segundo a literatura, a formação dessas estruturas anteriormente ao locus da inversão está estreitamente ligada à formação de nanoemulsões tanto no método do EPI quanto no método do PIT (FERNANDEZ *et al.*, 2004; IZQUIERDO *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2003, MORAIS *et al.*, 2006a; FORGIANINI *et al.*, 2001). Os resultados da análise, macroscópica e microscópica estão descritos nas **tabelas 19 e 20**.

#### 5.4.1.2 – EMULSIFICAÇÃO COM AQUECIMENTO DE FASES

As emulsões preparadas a  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$  apresentam glóbulos bastante homogêneos e diminutos, sendo que o tamanho dos glóbulos é menor em relação àquelas preparadas pela emulsificação a frio (**Tabelas 19 e 20**).

As emulsões manipuladas à temperatura de  $75\pm 2^{\circ}\text{C}$  apresentaram aspecto macroscópico leitoso, com odor característico do óleo e nenhum sinal de instabilidade macroscópica após 48 horas do preparo. Quanto ao aspecto microscópico, estas amostras apresentaram glóbulos de tamanhos variados e bastante diminutos quando visualizados ao microscópio (aumento de 400X).

LIU *et al.*, (2006) em seus experimentos utilizando óleo mineral e o par de tensoativos *polissorbato 80/ monooleato de sorbitano*, observaram que houve diminuição no tamanho dos glóbulos de 120 para 74 nm quando a temperatura de preparo das emulsões aumentou de 30 para  $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Com o aumento da temperatura de emulsificação ocorre uma diminuição na viscosidade da fase oleosa e conseqüentemente diminuição das forças de coesão entre as moléculas, facilitando a solubilização do óleo no tensoativo, o que predispõe a formação de glóbulos de pequeno diâmetro (LIU *et al.*, 2006; MORALES *et al.*, 2003).

Assim, diferentes tamanhos de glóbulos podem ser obtidos dependendo do método de emulsificação escolhido, que explica a influência do método de obtenção na estabilidade do

sistema obtido (FERNANDEZ *et al.*, 2004; JEONG; OH; KIM, 2001; MORAIS *et al.*, 2006a).

Os resultados sugerem que a temperatura é um fator relevante para formação de glóbulos nanométricos nestes sistemas. Quando se discutir a respeito dos sistemas formulados nesta pesquisa, deve-se considerar para a formação de uma nanoemulsão estável a temperatura entre  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os resultados das análises de distribuição e tamanho dos glóbulos mostraram que o método de emulsificação com aquecimento de fases foi mais eficiente na obtenção de nanoemulsões estáveis e com menor tamanho de partícula, quando comparada à nanoemulsão obtida pelo método de emulsificação à frio. Os resultados da análise, macroscópica e microscópica estão descritos nas **tabelas 19 e 20**.

**Tabela 19** – Características macro e microscópicas das formulações em função da temperatura de emulsificação.

Formulação	Temperatura ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ )		
	25	75	85
<b>Oliva A</b>	Emulsão pouco translúcida, fina, pouco azulada/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea	Emulsão leitosa, fina, pouco azulada/ Glóbulos pequenos, alguns grandes, aglomerados floculados, heterogênea	Emulsão translúcida, azulada, fina/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea
<b>Suva A</b>	Emulsão pouco translúcida, fina, pouco azulada/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea	Emulsão leitosa, fina, pouco azulada/ Glóbulos pequenos, alguns grandes, aglomerados floculados, heterogênea	Emulsão translúcida, azulada, fina/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea
<b>Soliva A</b>	Emulsão pouco translúcida, fina, pouco azulada/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea	Emulsão leitosa, fina, pouco azulada/ Glóbulos pequenos, alguns grandes, aglomerados floculados, heterogênea	Emulsão translúcida, azulada, fina/ Glóbulos muito pequenos, movimento browniano, homogênea

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila



**Tabela 20** – Média do tamanho (nm) e desvio padrão dos glóbulos das emulsões conforme a temperatura de emulsificação (n=3).

Formulações	Temperatura ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ )		
	Emulsificação a frio	Emulsificação com aquecimento das fases	
	25	75	85
<b>Oliva A</b>	280 $\pm$ 65	405 $\pm$ 112	119 $\pm$ 32
<b>Suva A</b>	255 $\pm$ 54	390 $\pm$ 102	185 $\pm$ 38
<b>Soliva A</b>	275 $\pm$ 59	398 $\pm$ 114	154 $\pm$ 29

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila,

#### 5.4.2 – INFLUÊNCIA DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS COMPONENTES

A localização do tensoativo pode representar importante papel na dinâmica da emulsificação, favorecendo ou não a formação de glóbulos de tamanho reduzido (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003).

As emulsões foram preparadas conforme **item 4.2.4.2**. As formulações preparadas pelos métodos B, C e D, apresentaram cremeação em 24 horas, e separação de fases de 2 a 3 dias após a manipulação, em contrapartida todas as formulações preparadas pelo método A se apresentaram estáveis macroscopicamente.

A análise microscópica das emulsões preparadas pelos métodos C e D, revelaram a presença de glóbulos grandes, floculados, com distribuição heterogênea de tamanho nas amostras analisadas. O que contrasta com as formulações obtidas pelo método A, que apresentaram aparência homogênea, reflexo azulado (característica de nanoemulsão) e glóbulos de tamanho diminuto com presença de movimento browniano, conforme **tabela 21**.

**Tabela 21** – Tamanho dos glóbulos (nm) e desvio padrão das formulações preparadas pelo método A (n=3).

Formulação	Tamanho de glóbulo (nm)
Oliva A	115 ± 25
Suva A	187 ± 34
Soliva A	168 ± 28

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila,

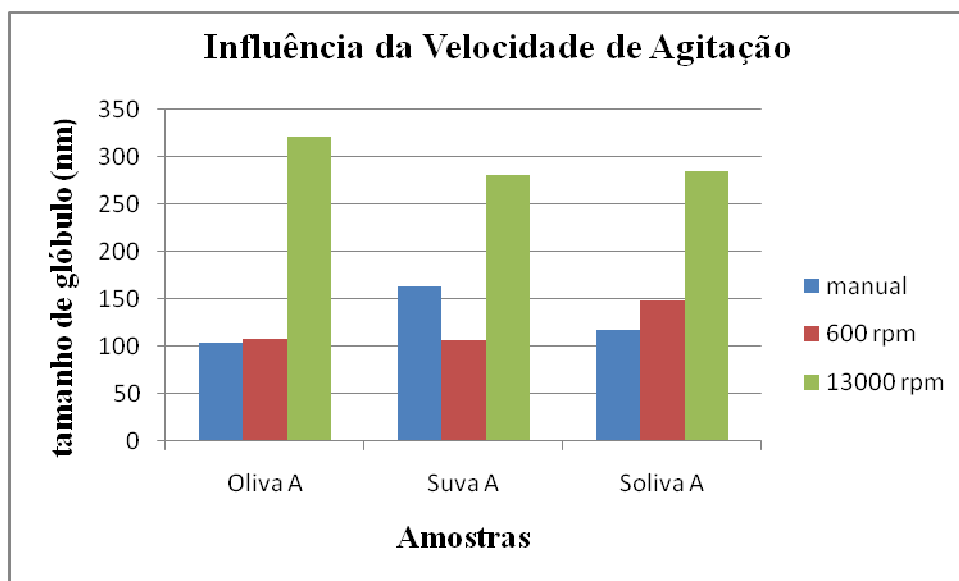
Já quando manipuladas pelo método B é possível visualizar gotas de óleo no campo microscópico em análise para todas as amostras logo após o preparo, indicando ineficiência do par de tensoativos em dispersar a fase oleosa e, que a fase na qual o tensoativo é solubilizado determina sua eficiência de emulsificação, independente da quantidade e valor de EHL empregado.

Estes resultados sugerem que o mecanismo de emulsificação por inversão de fases (EPI OU EIF) é determinante para obtenção de glóbulos nanométricos a partir do sistema proposto. MOLLINET; COLLIE; BLACK (1961) relataram que a adição de tensoativos que facilmente se solubilizavam na fase oleosa, também se difundiriam mais rapidamente para interface, formando assim a interface entre as fases aquosa e oleosa mais prontamente.

FERNANDEZ *et al.*, (2004), estudando o sistema constituído da mistura dos tensoativos não iônicos *ceteareth-5 / ceteareth-25* e óleo mineral, constataram que as emulsões preparadas pelo método B originam macromulsões com tamanho de glóbulo em torno de 10 µm. No entanto, a mesma formulação preparada pelo método A apresentou glóbulos em torno de 300 nm. Isto indica que a ordem de adição das fases possui papel fundamental na obtenção de emulsões com glóbulos na escala nanométrica. Demonstrando a eficiência da emulsificação frente ao par de tensoativos usado para dispersar as fases oleosa e aquosa.

### 5.4.3 – INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

A velocidade de agitação influenciou consideravelmente a obtenção de sistemas nanoemulsionados a partir da formulação escolhida. As emulsões foram preparadas conforme **item 4.2.2.5**. Com o emprego de agitação mecânica houve formação de nano glóbulos que, entretanto, diminuíram em quantidade e tamanho com o aumento da agitação, sendo a velocidade de agitação de 600 rpm a que apresentou sistemas com tamanhos de glóbulos mais homogêneos, conforme **figura 21**.



**Figura 21** – Influência da velocidade de agitação no tamanho de glóbulo das nanoemulsões Oliva A, Suva A e Soliva A. Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila.

A distribuição granulométrica de um sistema em dispersão depende da velocidade de agitação entre as fases dispersa e dispersante durante o processo de emulsificação e da velocidade de adição de uma das fases sobre a outra (BROOKS; RICHMOND; ZERFA, 1998).

O tamanho dos glóbulos de uma emulsão determina a probabilidade da ocorrência de fenômenos como floculação e coalescência. Geralmente, quanto menor o tamanho dos glóbulos dispersos, maior a estabilidade do sistema (JEONG; OH; KIM, 2001).

Durante o processo de agitação inicial, os glóbulos da fase dispersa são formados, no

entanto, à medida que a agitação continua a probabilidade de colisão entre os glóbulos aumenta e a coalescência pode ocorrer (FERNANDEZ *et al.*, 2004; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). É impossível, porém prever o tempo e a velocidade de agitação que predispõe a formação e estabilização das gotículas formadas. As razões para que o fenômeno de estabilização das gotículas seja dependente do tempo e velocidade de agitação, podem ser atribuídas à distribuição do tensoativo entre as fases, à formação lenta do filme interfacial sobre os glóbulos ou à interrupção da formação do filme por agitação contínua (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

SOLÉ *et al.*, (2006) observou que a emulsificação por alta energia utilizando Ultra Turrax e ultrassom, produz emulsões com tamanho de glóbulo superior às preparadas pelo método de EPI, em sistema composto por oleato de potássio - ácido oléico -C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> / hexadecano. Neste mesmo experimento constatou que as nanoemulsões com glóbulos menores são formadas por alta velocidade de agitação desde que haja baixo fluxo de adição da fase aquosa. (FORGIANINI *et al.*, 2001; MORALES *et al.*, 2003; IZQUIERDO *et al.*, 2004).

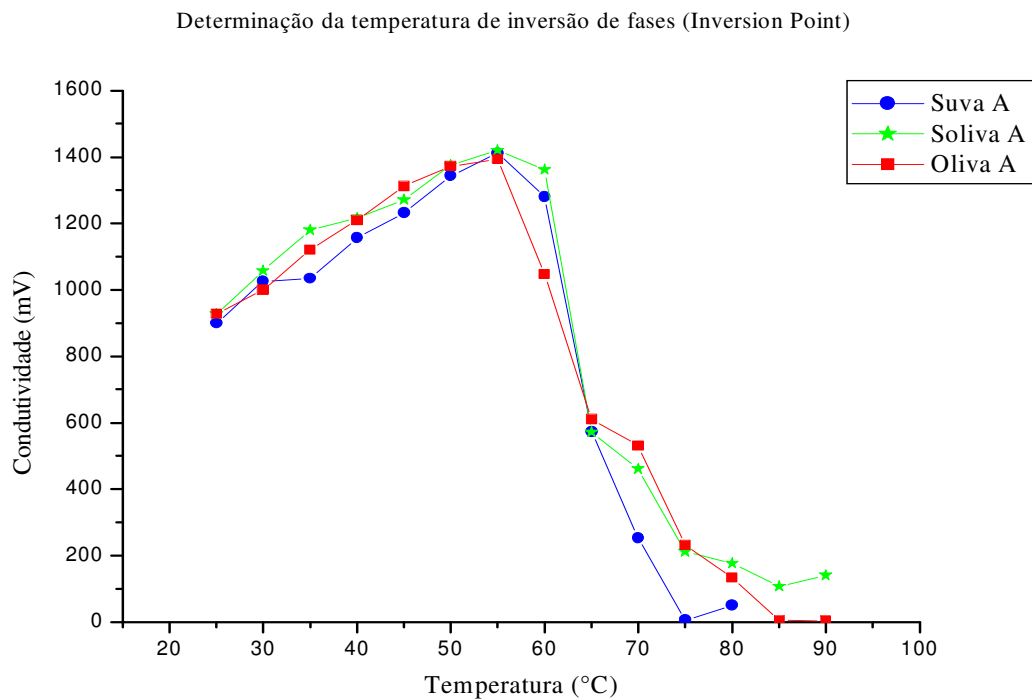
Isso sugere que o fator mais importante na formação de nanoemulsões pelo método do EPI é a completa solubilização do óleo na fase bicontínua (MORALES *et al.*, 2003), não necessitando de alta velocidade de agitação para sua formação.

## **5.5 – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INVERSÃO DE FASES ATRAVÉS DA MEDIDA DA CONDUTIVIDADE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

Com este teste foi possível verificar a ocorrência da inversão de fases pela temperatura nas emulsões Oliva A à 85°C e Suva A à 75°C onde a condutividade atinge valores próximos a 0mS/cm (**Figura 22**). A diminuição brusca nos valores de condutividade elétrica apresentadas na emulsão Soliva A indica uma provável reorganização do sistema, porém não é possível afirmar que esteja havendo inversão de fases, já que a condutividade elétrica não decai a valores muito baixos,

próximos a zero como relatado na literatura (ANTON, *et al.*, 2007; IZQUIERDO *et al.*, 2001). Porém, acredita-se que a emulsificação por inversão da fração volumétrica (EPI) também tenha participação na formação destas nanoemulsões, pois anteriormente foi possível manipular emulsões pelo método à frio ( **item 4.2.4.1.1**).

Foram observadas várias fases de transição até o ponto no qual ocorreu a inversão de fases formando uma emulsão O/A. Observou-se que a queda da condutividade elétrica ocorreu em temperaturas bem próximas à utilizada para a emulsificação das emulsões. Segundo CAMARGO (2008), sabe-se que a temperatura na qual ocorre a inversão de fases da emulsão, possui grande correlação quanto ao tipo de fase oleosa empregada na formulação.



**Figura 22** – Gráfico da determinação da temperatura de inversão de fases, através da medida da condutividade elétrica (mV) em função da temperatura (°C) das nanoemulsões Oliva A, Suva A e Soliva A. Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila

## 5.6 – DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

O método desenvolvido por MANSUR (1984) demonstrou ser eficaz e rápido, já tendo sido utilizado em outros trabalhos (BARTH; SANTOS; SOARES, 2000; FERRARI, 2002; SANTOS *et al.*, 1999).

A determinação do FPS foi feita, usando como padrão uma emulsão comercial FPS 15, como descrito no rótulo e que continha na fórmula metoxicinamato de octila.

O padrão analisado conforme o método de MANSUR (1984), apresentou FPS 12. As amostras que continham somente o óleo, Oliva A, Suva A e Soliva A, não demonstraram ação fotoprotetora, enquanto que as que possuíam metoxicinamato de octila, Oliva B, Suva B e Soliva B, apresentaram FPS em torno de 12, semelhante ao padrão. Segundo MANSUR (1984) devemos sempre usar um valor inteiro do FPS encontrado para o valor acima mais próximo.

A análise estatística mostrou que não houve variação significativa entre as amostras que possuíam filtro e o padrão. Na **tabela 22**, encontram-se expressos a média dos valores do FPS das emulsões, as amostras foram analisadas em triplicata.

**Tabela 22** – Análise e desvio padrão do FPS das nanoemulsões Oliva B, Suva B, Soliva B e do padrão comercial segundo teste descrito por MANSUR (1984) (n=3)

Formulação	FPS
Oliva B	12,17±0,20
Suva B	12,50±0,52
Soliva B	12,75±0,16
Padrão	12,71±0,22

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila

## 5.7 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOEMULSÕES

De acordo com DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA (2005), existe atualmente uma tendência em se usar produtos vegetais como antioxidantes por serem de origem natural. Nesses casos, porém, um fator importante a se considerar é se os ativos antioxidantes do produto continuarão apresentando essa atividade após serem incorporados em uma formulação de uso tópico.

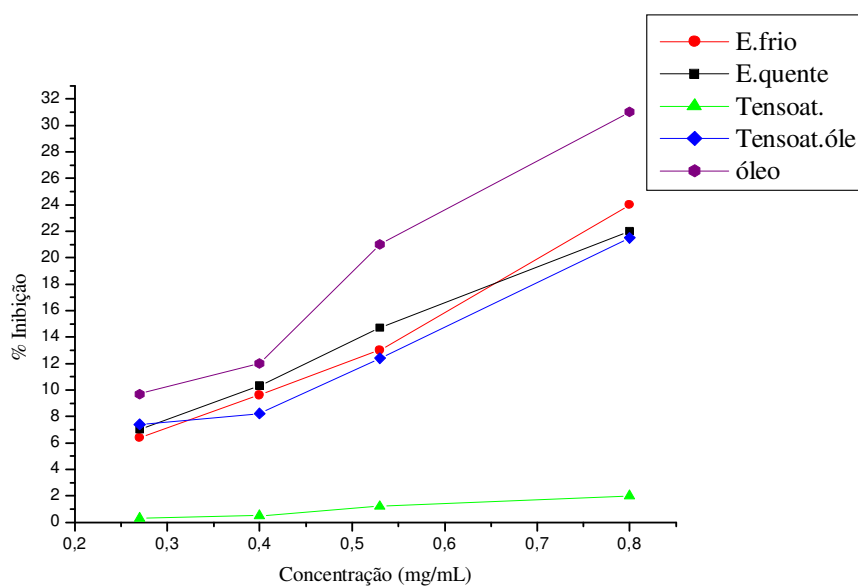
Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos vegetais baseiam-se na habilidade do antioxidante em seqüestrar radicais livres ou inibir a peroxidação lipídica, e em razão da complexidade de compostos nos produtos, sugere-se avaliar a propriedade anti-radicaís livres por dois ou mais métodos (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Um dos métodos mais adequados para avaliar a capacidade antioxidante em formulações cosméticas é o DPPH•, que é um radical estável em solução e que reage com compostos capazes de doar elétrons. Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH•, que absorve no comprimento de onda de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005). Após o equilíbrio da reação verifica-se a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH• (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

As vantagens desse método são: avaliar rapidamente uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo; é um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado; permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol. Em contrapartida, o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de

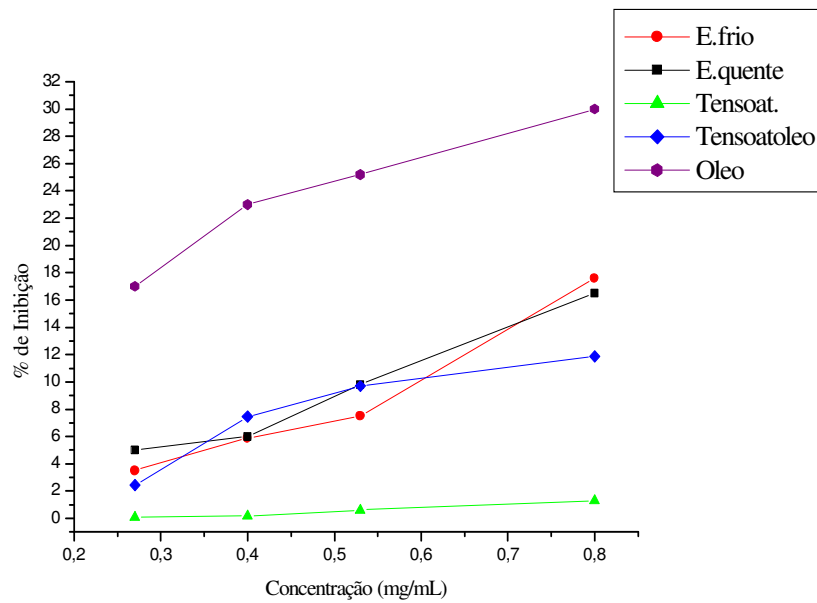
transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Para isto, comparamos a emulsão preparada com aquecimento das fases, emulsão à frio, solução micelar dos tensoativos, solução micelar dos tensoativos acrescidas do óleo e o óleo puro. Todas as amostras foram preparadas com a mesma quantidade de óleo (**Figuras 23, 24 e 25 Tabela 23**).



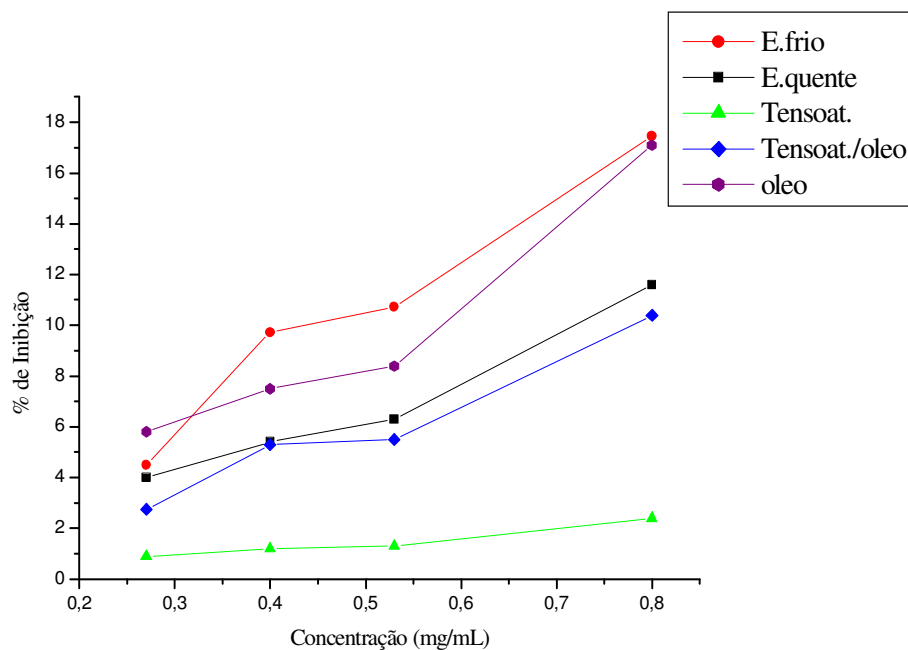
**Figura 23** – Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para as emulsões com óleo de Oliva A (óleo de oliva 10%, sistema tensoativo 10% e água 80%). E. frio= Emulsificação à frio, E. quente= Emulsificação com aquecimento de fases, Tensoat. = Solução micelar, Tensoat. Olé = solução micelar + óleo, óleo = óleo puro





**Figura 24** – Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para a emulsão Suva A (óleo de semente de uva 10%, sistema tensoativo 10% e água 80%).

E. frio= Emulsificação à frio, E. quente= Emulsificação com aquecimento de fases, Tensoat. = Solução micelar, Tensoat. Olé = solução micelar + óleo, óleo = óleo puro



**Figura 25** – Determinação da atividade redutora do radical DPPH• para a emulsão Soliva A (óleo de oliva 2,5%, óleo de semente de uva 7,5%, sistema tensoativo 10% e água 80%).

E. frio= Emulsificação à frio, E. quente= Emulsificação com aquecimento de fases, Tensoat. = Solução micelar, Tensoat. Olé = solução micelar + óleo, óleo = óleo puro

**Tabela 23** – Cálculo da IC<sub>50</sub> para a atividade redutora do radical DPPH• das emulsões.

% Inibição (mg/mL)	Oliva A		Suva A		Soliva A	
	E. Frio	E. quente	E. Frio	E. quente	E. Frio	E quente
<b>IC 50</b>	1,60	1,76	2,05	2,30	2,21	3,51

Legenda: Oliva A (emulsão com óleo de oliva), Suva A (emulsão com óleo de semente de uva), Soliva A (emulsão com óleo de oliva/ semente de uva). E. Frio = emulsão preparada sem aquecimento de fases. E. quente = emulsão preparada com aquecimento de fases. IC50 = Concentração inibitória 50%

Os gráficos das **figuras 23, 24 e 25** mostram a atividade antioxidante das emulsões. Embora as emulsões preparadas à temperatura ambiente ou a frio apresentem maior atividade antioxidante quando comparadas àquelas preparadas a quente, essa diferença não é estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) (RAMALHO; JORGE, 2005).

Os resultados apresentados acima permitem escolher o método de preparação que será mais viável para a indústria, sem perda da atividade antioxidante.

## **5.8 – ESTUDO PRELIMINAR DE PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO***

A capacidade de uma molécula de permear através da pele e exercer um determinado efeito biológico ou até mesmo tóxico dependem tanto de suas propriedades físico-químicas como daquelas relacionadas ao veículo utilizado para sua administração. Assim, o estudo de permeação e retenção cutânea do metoxicinamato de octila foi realizado através da utilização de nanoemulsões compostas de óleos vegetais com diferentes constituições. Os resultados obtidos no teste de permeação e retenção cutânea estão expressos na **figura 26** e na **tabela 24** abaixo descritas.

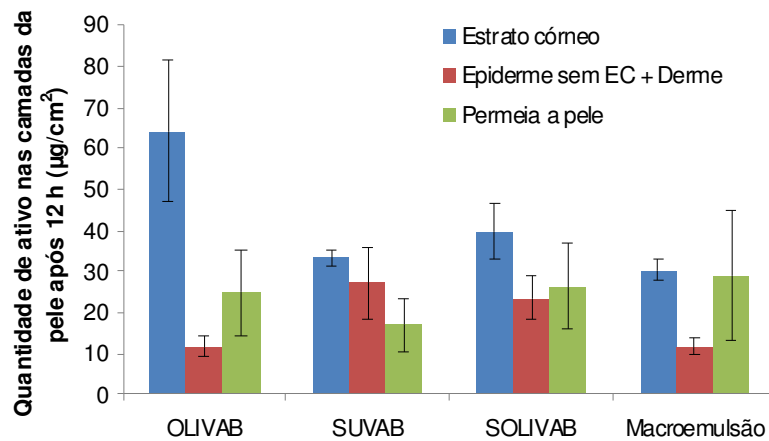
Para o extrato etanólico de pele, a absorbância foi de 210nm, e para o extrato etanólico da fita, a absorbância foi de 250nm, sendo assim verificou que não há interferência dos referidos extratos no comprimento de onda de análise (311nm).

As emulsões Suva B e Soliva B (Suva B = óleo de semente de uva 10%, sistema tensoativo 10%, metoxicinamato de octila 7,5% e água 72,5% e Soliva B = óleo de oliva 2,5%, óleo de semente de uva 7,5%, sistema tensoativo 10%, metoxicinamato de octila 7,5% e água 72,5%), quando comparadas com a macroemulsão não apresentaram diferença estatística. Já a emulsão Oliva B (Oliva B = óleo de oliva 10%, sistema tensoativo 10%, metoxicinamato de octila 7,5% e água 72,5%) apresentou maior retenção, sendo estes valores estatisticamente significativos ( $p < 0,01$ ) em relação à macroemulsão. Estes resultados nos mostram que as nanoemulsões podem ser usadas com segurança e eficácia, pois não proporcionam maior permeação que a macroemulsão usada como controle, visto que as formulações são acrescidas de filtro solar e, assim, é desejável que permaneçam na superfície da pele ou com permeação mínima até a derme, local onde os raios solares atingem, como observado pela **figura 3**.

**Tabela 24** – Quantidade de ativo na pele após 12 h ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=3).

	<b>Oliva B</b>	<b>Suva B</b>	<b>Soliva B</b>	<b>Macroemulsão</b>
<b>Estrato córneo</b>	64,37 ± 17,34	33,31 ± 1,78	39,91 ± 6,9	30,46 ± 2,51
<b>Epiderme sem EC + Derme</b>	11,71 ± 2,71	27,17 ± 8,63	23,71 ± 5,41	11,67 ± 1,96
<b>Solução receptora</b>	25,04 ± 10,42	17,02 ± 6,7	26,47 ± 10,32	29,09 ± 16,06

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.



**Figura 26** – Gráfico da quantidade de ativo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nas camadas da pele após 12hs de permeação. Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.

MARTY *et al.*, 2004 em seus experimentos com diferentes filtros solares químicos, descreveu a permeação de alguns deles, entre os quais o metoxicinamato de octila. Porém relatou que a presença de filtro solar na solução receptora não é indicativo de que este irá chegar até a corrente sanguínea, uma vez que a pele utilizada para o estudo não possui a derme total e sim parte dela. Outros autores também relataram que os filtros solares químicos em sua maioria permeiam, por serem lipofílicos, mas não causam toxicidade, pois não chegam até as camadas mais profundas da pele e conseqüentemente à corrente sanguínea.

SASSON, 2006, fazendo experimentos de permeação com uma mistura de filtros solares e diferentes veículos, verificou que era encontrado filtro solar lipofílico na solução receptora, quando o veículo testado foi uma macroemulsão. Essa permeação ocorre, pois a maioria dos filtros solares são lipofílicos o que aumenta a permeabilidade na pele.

Quando comparamos as nanoemulsões entre si, Suva B e Soliva B não apresentam diferença significativa. Já quando comparadas com Oliva B existe diferença significativa ( $p < 0,01$ ). Esta diferença deve ser atribuída à constituição dos óleos, uma vez que o óleo de oliva é rico em ácido oléico e o óleo de semente de uva rico em ácido linoléico. Observando o

gráfico a emulsão Soliva B, formada da mistura dos óleos, apresenta permeação e retenção intermediária frente as emulsões constituídas apenas por um óleo, Suva B e Oliva B.

Acredita-se que a retenção ocorrida na emulsão Oliva B se deva à presença de ácido oléico em grande quantidade no óleo de oliva. Ácido graxo este, presente em praticamente todos os óleos e gorduras originados de plantas e animais, porém no óleo de oliva é encontrado em maior quantidade. Este ácido também é encontrado abundantemente nos lipídeos do estrato córneo (EC) humano (LAMPE *et al.*; 1983). O ácido oléico tem sido descrito como promotor da permeação e retenção de muitos fármacos, entre eles: ácido salicílico (COOPER, 1984), ácido retinóico, hidrocortisona, aciclovir (CAROLLO, 2007), entre muitos outros.

CAROLLO (2007) em seus estudos constatou que o ácido oléico influenciava como promotor de absorção aumentando a retenção cutânea do ácido 5- ALA, o que mostra que a constituição da fase oleosa é um fator bastante importante na retenção e permeação de ativos.

### **5.9- ENSAIO DE IRRITAÇÃO EM MODELO ORGANOTÍPICO – HET – CAM**

Os resultados do ensaio em membrana corioalantóide estão apresentados na **tabela 25** e correspondem ao tempo de aparição dos diferentes efeitos provocados pelos produtos testados. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos nos três ovos analisados por produto.

**Tabela 25** – Classificação, pontuação e desvio padrão dos produtos após o teste de irritação em modelo organotípico – HET- CAM (n = 3).

<b>Produtos testados<sup>a</sup></b>	<b>Pontuação</b>	<b>Classificação</b>
<b>Oliva A</b>	1,6 ± 0,3	Ligeiramente irritante
<b>Oliva B</b>	4,6 ± 1,3	Ligeiramente irritante
<b>Suva A</b>	1,1 ± 0,5	Ligeiramente irritante
<b>Suva B</b>	3,8 ± 1,5	Ligeiramente irritante
<b>Soliva A</b>	1,4 ± 0,4	Ligeiramente irritante
<b>Soliva B</b>	4,0 ± 1,4	Ligeiramente irritante
<b>Span 80®</b>	6,5 ± 1,3	Moderadamente irritante
<b>Ulтроil R 300®</b>	5,8 ± 1,1	Moderadamente irritante

<sup>a</sup>: A concentração testada de tensoativo foi de 10% e das emulsões de 100%.

Oliva= óleo de oliva, Suva= óleo de semente de uva e Soliva = óleo de semente de uva + óleo de oliva, A= formulações que não contêm metoxicinamato de octila, B= formulações que contêm metoxicinamato de octila.

O ensaio em membrana corioalantóide surgiu como alternativa viável ao ensaio de Draize usado para avaliar a irritação ocular de produtos cosméticos solúveis em água (STEILING *et al.*, 1999; DOUCET, *et al.*, 1999). O mesmo se mostrou eficiente na identificação de produtos irritantes, porém conforme descrito na literatura possui baixa sensibilidade para classificar produtos moderadamente irritantes (DEBBASCH *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com a exposição da membrana aos tensoativos à 10%, mostrou que estes são moderadamente irritantes.

Quando testadas, as emulsões Oliva A, Suva A e Soliva A apresentaram ligeiro potencial irritante, porém o valor das pontuações está no limiar inferior, sendo estas quase não irritantes. O mesmo já não acontece com as emulsões Oliva B, Suva B e Soliva B que apresentaram potencial ligeiramente irritante, porém a pontuação se encontra no limite superior, sendo estas quase moderadamente irritantes. Estes altos valores se devem ao

metoxicinamato de octila que as formulações contem que associado com os tensoativos aumenta o potencial de irritabilidade.

Isso condiz com os resultados apresentados por ZANATTA, 2008, que testando outros tensoativos etoxilados e derivado do óleo de rícino também obteve resultados semelhantes.

Assim como mencionado por outros autores, o ensaio HET-CAM se mostrou eficiente na determinação do potencial irritante dos produtos contendo tensoativos e emulsões (ROGIER *et al.*, 1992; DEBBASH *et al.*, 2005; ALANY *et al.*, 2006). Entre os parâmetros utilizados para determiná-lo, supões-se que a coagulação, seja o último é o melhor para avaliar a ação irritante de um produto, pois apresenta boa correlação com a concentração do mesmo e é o primeiro a ser observado após a incorporação do produto à membrana corioalantóide (VIVES *et al.*, 1997). Para complementar esses resultados, outros métodos poderiam ser empregados para a comparação na faixa considerada dos valores.

## **6-CONCLUSÕES**



---

## 6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir:

- O óleo de oliva foi o que apresentou melhor atividade antioxidante em relação aos outros óleos testados;
- O valor de EHL requerido pelos óleos de oliva e semente de uva é 8,0;
- Através do diagrama ternário foi possível a determinação de uma nanoemulsão estável;
- É possível obter nanoemulsões fisicamente estáveis contendo óleo de oliva e/ou óleo de semente de uva, a partir do tensoativo hidrofílico PEG- 30 castor oil associados ao lipofílico, monooleato de sorbitano;
- É possível obter emulsões fisicamente estáveis contendo óleo de oliva e/ou semente de uva, aditivadas de metoxicinamato de octila, a partir do tensoativo hidrofílico PEG- 30 *castor oil* associados ao lipofílico, monooleato de sorbitano;
- A granulometria do sistema contendo tanto óleo de oliva e /ou semente de uva, aditivadas ou não de metoxicinamato de octila não demonstrou relevante alteração;
- Ambos os métodos de inversão de fases PIT e EPI estão envolvidos na processo de obtenção das nanoemulsões propostas;
- É possível determinar a temperatura de inversão de fases das emulsões contendo óleo de oliva e óleo de semente de uva;
- A emulsificação pelo método do EPI sem a utilização de aquecimento demonstrou-se eficiente na formação de nano emulsões, porém houve aumento da granulometria quando comparadas as emulsões preparadas com aquecimento das fases;
- A ordem de adição dos componentes é um fator bastante importante para a obtenção das nanoemulsões;
- A velocidade de agitação ideal para a formação dos sistemas propostos é de 600 rpm.

- 
- As nanoemulsões apresentaram FPS *in vitro* em torno de 12 quando aditivadas de metoxicinamato de octila, enquanto o valor do FPS na ausência de filtro foi quase nulo;
  - As nanoemulsões que não continham metoxicinamato de octila não apresentaram nenhum FPS pelo método *in vitro* aplicado;
  - O método de preparação das nanoemulsões não influencia na atividade antioxidante das mesmas;
  - As nanoemulsões não apresentaram permeação significativa quando comparadas a uma macroemulsão, quando testadas *in vitro*;
  - A constituição da fase oleosa influencia na retenção das nanoemulsões, quando testadas *in vitro*;
  - O óleo de oliva apresenta maior retenção do ativo, devido a grande quantidade de ácido oléico presente na sua constituição;
  - Os tensoativos usados para o desenvolvimento das nanoemulsões se mostraram moderadamente irritantes;
  - As nanoemulsões se mostraram ligeiramente irritantes, principalmente as que continham OMC.
  - As nanoemulsões obtidas podem ser consideradas estáveis frente às metodologias de avaliação e análise empregadas.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. (2004). **Séries Temáticas**. Série Qualidade 1, 1: 19-21, 2004.

AGROFOOD. Overview of Polyphenols. **Agrofood industry hi-tech**, p.10-11, march/april 2004.

ALANY, R.G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I.G.; DAVIES, N.M. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **Journal of Controlled Release**, v. 111, p. 145–152, 2006.

AMORI, S.; ANGELI, N. G.; DARAIO, M. E.; DICELIO, L. E. Fotofísica y fotoquímica de filtros solares. In: Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, 15, Buenos Aires, 2001. **Anais**. Buenos Aires, Asociación Argentina de Químicos Cosméticos, p. 539-545, 2001.

ANSEL, M. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V J. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de liberação de fármacos**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Premier (Ed.), p. 281-316, 1999.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by PIT method: an investigation on role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, **Séries Temáticas**, Brasília, 2002.

BACCOURI, O.; GUERFEL, M.; BACCOURI, M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; LERCKER G.; ZARROUK, M.; MILED, D.D.M; Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oil with regard to fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 743-754, 2008.

BAIL, S.; STUEBIGER, G.; KRIST, S.; UNTERWEGER, H.; BUCHBAUER, G.; Characterization of Various Grape Seed Oils by Volatile Compounds, Triacylglycerol Composition, Total Phenols and Antioxidant Capacity. **Food Chemistry**, 2007

BARTH, A. L., SANTOS, E. P., SOARES, K. C., Análise e seleção de filtros solares químicos com alta qualidade em proteção solar. In: Congresso de Ciências Farmacêuticas do Rio de Janeiro, Riopharma, 1999, Rio de Janeiro, RJ, **Anais**, p. 25-27, 2000.

BASILE, D.; **Alimentos & Tecnologia**, v. 19, p.13, 1896.

BAUMANN, L. **Dermatologia Cosmética: Princípios Básicos**, Revinter, Rio de Janeiro, 2005

BECHER, P. Emulsions: Theory and Practice. **American Chemical Society**: Washington, DC, 2001.

BECHER, S. E.; SCHICK, M. J. Macroemulsions. In: SCHICK, M. J. **Surfactant Science Series**, Nonionic Surfactants – Physical Chemistry. New York: Marcel Dekker Inc. (Ed.), v. 23, p.435-491, 1987.

- BECKER, P. **Emulsions: theory and practices**. New York, Reinhold, p.1, 1965.
- BENINCASA, C.; LEWIS, J.; PERRI, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 366–370, 2007.
- BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v.12, n. 2, p. 44-50, 2000.
- BERNE, B.; ROS, A-M. 7 years experience of photopatch testing with sunscreen allergens in Sweden. **Contact Dermatitis**, v. 38, p. 61-64, 1998.
- BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMEIJN, S.; VAN MEIJAGAARDEN, C.; KOERTEN, H.; VAN DER MEULEN, H.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; JUNGIENGER, H.; BORCHARD, G.; Cationic submicron emulsion for pulmonary DNA polymerization, **Journal of Controlled Release**, vol. 100, p. 145 – 155, 2004.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BOLDYREV, V.V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 2, n. 2, p. 143-145, 1995.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 280, p. 241-251, 2004
- BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL – NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 42, p. 1 – 36, 2003.
- BRACONI, F.L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M. N. F.; ROCHA-FILHO, P.A. Aplicação cosmética do óleo de canola. In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos, São Paulo, 1995, **Anais**. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p. 6-19, 1995.
- BROOKS, B. W.; RICHMOND, H.N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In: **Binks, B.P. Modern Aspects of Emulsion Science**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 175-203, 1998.
- CAMARGO, M. F. P. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá e óleo essencial de lavanda e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. Ribeirão Preto. **Dissertação** (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008
- CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1021; p. 117–124, 2003.

- CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions, **Advances in Colloid Interfacial Science**, Amsterdam, v. 107, p. 125-55, 2004.
- CAROLLO, A. R. H. Influência do ácido oléico como promotor de absorção cutânea para o ácido 5- aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele: estudos in vitro e in vivo em modelo animal. Ribeirão Preto. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2007.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Lausanne, v. 84, p. 21-27, 2006.
- CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Médica**, v. 64, p. 393-396, 1998.
- CHANAMAI, R.; HORN, G.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of Oil Polarity on Droplet Growth in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Weakly Adsorbing Biopolymer or a Nonionic Surfactant. **Journal of Colloid Interface Science.**, v. 247, p. 167–176, 2002.
- COMELLES, F.; MEGIAS, V.; SÁNCHEZ, J.; PARRA, J.L.; COLL, J.; BALAGUER, F.; PELEJERO, C. Applications of ternary systems in specific cosmetic formulations. **International Journal of Cosmetics Sciences**, v. 11, p. 5-19, 1989.
- CONDE, C.; DELROT, S.; GERÓS, H.; Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1545-1562, 2008.
- CONDORÍ, B.; AHEDO, M. I.; CABRERA, V.; STEIN, M. S. Estabilidad de protectores solares en formulaciones cosméticas. In: Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, 15, Buenos Aires, 2001. **Anais**. Buenos Aires, Asociación Argentina de Químicos Cosméticos, p. 504-512, 2001.
- COOPER, E. R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n.8, p. 1153- 1156, 1983.
- COSTA, C.K.; Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulações cosméticas. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Curitiba, 2007.
- COULTER DELSA 440 MANUAL **Langley Ford Instruments**. Hialeah, FL, USA, june, 1988.
- COUTEAU C.; CULLEL, N.P.; CONNAN, A.E.; COIFFARD, L.J.M. Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human, **International Journal of Pharmaceutics**; v. 222, p. 153–157, 2001.
- CROY, S. R.; KNOW. G. S. Polysorbate80 and Cremophor EL micelles deaggregate and solubilize Nystatin at the core-corona interface. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 11, p. 2345-2354, 2005.

CTFA 1999. International Buyer's Guide, Washington, The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 1999.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, p. 204–213, 2005.

DE ROSSO, V. V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z.; Determination of anthocyanins from acerola and acai by HPLC – PDA – MS / MS , **Journal of Fruits Composition and Analysis**, V. 21, Pages 291-299, 2008

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGHE, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food Chemical Toxicology**, v. 43, p. 155–165, 2005.

DELAIR, T. DNA interactions with functionalized emulsion, In: SCHWARZ, J. A.; CONTESCU, C. I.; PUTYERA, K. (ed) **Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2004.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação in vitro da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 17, n. 4, p. 74-78, jul.-ago. 2005

DOUCET, O.; LANVIN, M.; ZASTROW, L. Comparison of three in vitro methods for the assessment of the eye irritation potential of formulated products. **In Vitro Molecular Toxicology**, v. 12, p. 63–76, 1999.

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.

EL- BURY, S.; COUTEAU, C.; BOULANDE, L.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 1–5, 2006

ESQUENA, J.; SOLANS, C. **Program of Colloid Polymer Science**, v. 110, p. 235-239, 1998.

ESTEVE, M. M.; KRIESTEN, R. M. Estudo de um complexo ativo para prevenção do envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 2, n.1, jan/fev, p. 31-40, 1990.

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

- FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*carapa guyanensis*). **Tese** (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2002.
- FERRARI, M. Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba. Ribeirão Preto. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. p. 147, 1998.
- FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. In: **Plantas Florianópolis: UFSC**, p 489-573, 1999.
- FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M. P. Protection of human against the effects of sunburn ultraviolet. In: **Sunlight and man, normal and abnormal photobiological responses**. Fitzpatrick, T.B.; & al (eds). University of Tóquio Press, Tóquio, p. 751, 1974.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORRÊA, M. A. Protetores Solares. **Química Nova**, v. 30, n.1, São Paulo, 2007
- 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.
- FORTUNATO, E. As metas da nanotecnologia: Aplicações e implicações. Universidade do Porto, Portugal, 2007.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 12, p. 1723-1727, 1998.
- FREI, B.; HIGDON, V. Antioxidant activity of Tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **American Society for Nutritional Sciences**, Bethesda, p.3275S-3284S, 2003.
- FREITAS, L.S.; Desenvolvimentos de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. **Tese** (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade do Rio Grande do Sul, 2007.
- GARCIA, S., SANTOS, E. P., LIMA, M. T. L., Associação de filtros solares com extrato vegetal, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 7, p. 38-40, 1995
- GONÇALVES, R. A. Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. São Paulo, 2000. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.
- GROSSIORD, J.L. PVP in multiple emulsion. **Cosmetics & Toiletries**, n. 9, p. 53 – 57, 1995.
- GRUIJL, F. R.; VAN KRANEN, H. J.; MULLENDERS, L. H. F., UV induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemic and Photobiology**, v. 63, p. 19-27, 2001.



GUERRA FILHO, S. S.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 6, n. 2, p. 51-54, mar./abr. 1994.

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

GUTERRES, S. S.; PASA, A. A.; PIMENTA, M. A. Raio X da nanociência brasileira. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC. 58. 2006. Florianópolis. p. 9-13. **Anais eletrônicos**, disponível em: [http://www.sbpcnet.org.br/arquivos/arquivos\\_181](http://www.sbpcnet.org.br/arquivos/arquivos_181), consultado em 10 abril de 2008

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HEIM, K., E.; TAGLIAFERRO, A., R.; BOBILYA, D., J. Flavonoid, In: HEM, S.L.; FELDKAMP, J.R.; WHITE, J.L. Basic chemical Principles Related to Emulsion and Suspension Dosage Forms, In: Lachman, L.; Lierberman, H.A.; Kanig, J.L. **The theory and Practice of Industrial Pharmacy**. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 100-122, 1986.

HENRY W.L.; KULLAVANIJAYA, P. Photoprotection, **Journal of American Academy of Dermatology**, p. 937 – 959, 2005.

HIRATA, L. L. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum. Curitiba, 95 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2004.

HOMLBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Ltd, New York, p. 451 – 471, 2002.

HU, G.; WANG, X.; Research on a natural sunscreen from Chinese herbs. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 175-181, 1998.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmetic Industry**, v. 142, n.1, p. 27-28, 30, 1993a.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmetic Industry**, v. 142, n.2, p.38, 40,42-43,72 1993b.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmetic Industry**, v. 143, n.12, p. 35-38, 72, 1988.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T.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, 2001.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T.F.; DEDEREN, J.C.; GARCIA, M.J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the PIT method. **Journal of Colloid and Interface Science**, new York, v. 285, p. 388-394, 2004.

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

KAROUGELOPOULOS, N.; MYLONA, A.; CHIOU, A.; IOANNOU, M.S.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Retention and distribution of natural antioxidants (α-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. **LWT**, v. 40, p.1008–1017, 2007.

KIM, E.; WON NAM, G.; KIM, S.; LEE, H.; MOON, S.; CHANG, I. Influence of polyol and oil concentration in cosmetic products on skin moisturization and skin surface roughness. **Skin Research and Technology**, p. 1- 8, 2007.

KIRCHOFF, V. W. J. H., Ozônio e radiação UVB; Transtec, São José dos Campos – SP, 1995

KLIGMAN, L.H.; KLIGMAN, A.M. The nature of photoaging: Its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, p. 215-217, 1986.

KOCHEVAR, I.E.; PATHAK, M.A.; PARRISH, J.A. Photophysics, photochemistry and photobiology. In FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M.; AUSTEN, K.F.; 4ed. **Dermatology in General Medicine**. New York, McGraw – Hill, Inc. 1993, cap. 131, p. 1627 – 1638, 1993.

KOTHEKAR, S.C. Rationalizing and producing nanoemulsions for personal care. **Cosmetics & Toiletries**, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, trad.: João F. Pinto e Ana Isabel Fernandez, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, vol. II, p. 509-1517, 2001.

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

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. Medfarma, 1º ed., p. 56-57. 2000

LÉPORI, L. R., **Miniatlas: a pele**. São Paulo: Soriak, p. 74-77, 2002

LEVER, W. F. **Histopatologia da pele**. 7º Ed. São Paulo: Manole, 1991.

LIEDTKE, S.; WISSING, S.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersion characteristics, International **Journal of Pharmaceutical**, v. 196, p. 183-185, 2000.

LIN, T.J.; KURIHARA, H.; OTHA, H.J. **Cosmetics Chemical**, v. 26, p. 121-139, 1975.

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

LOPEZ, R. F. V.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 1, p. 77-94, 2004.

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. Iontophoretic delivery of 5- aminolevulinic acid (ALA): Effect of pH. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n.3, p. 311-315, 2001.

LOPEZ- FERIA, S.; C´ARDENAS, S.; GARC´IA-MESA, J. A.; VALC´ARCEL, M. Usefulness of the direct coupling headspace–mass spectrometry for sensory quality characterization of virgin olive oil samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 411–417, 2006.

LUEPKE N.P. Hen's egg choriallantoic membrane test for irritation potential, **Food Chemical and Toxicology**, v. 23, p. 287-291, 1985.

LUND, T.; BERT, J.L.; ONARHEIM, H.; BOWEN, B.D.; REED, R.K. **Microvascular exchange during burn injury**. I: A review. *Circ Shock*, 28: 179-197, 1989.

LUND, T.; ONARHEIM, H.; REED, R.K. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. **World Journal of Surgery**, v. 16, p. 2-9, 1992.

MAA, Y. F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification, **Pharmaceutical Development of Technology**, v.4, n. 2, p. 233- 240, 1999.

MANSUR, J. S. Determinação do fator de proteção solar dos bronzeadores e filtros solares brasileiros em seres humanos e por espectrofotometria. Rio de Janeiro, 1984. 148p. **Tese** (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1984.

MARSZAL, L., HLB of Nonionic Surfactants: PIT and EPI methods, In: SCHICK, M. **Journal Surfactant Science Series**, Nonionic Surfactants – Physical Chemistry. New York: Marcel Dekker Inc. (Ed.), v. 23, p. 493-547, 1987.

MARTIN, A.N.; MEDWICK, T.; KING, R.E. **Remington's pharmaceutical sciences**, ed. 18, Easton, Mack, 1990.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química. 106p. 2005. **Dissertação** (Mestrado) UFRGS, Porto Alegre, 2005

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

MEYER, T.; WAIDELICH, D.; FRAHM, A. W. Separation and first structure elucidation of CremophorEL-components by hyphenated capillary electrophoresis and delayed extraction-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. **Electrophoresis**. Weinheim, v. 23, p. 1053-1062, 2002.

MIGUEL, L. **Formulações com óleo de sementes de uva “Suvalan”**. Porto Alegre: Fac. de Farmácia da UFRS, jun, 1983.

MILLER, D.J.; HENNING, T.; GRÜNBEIN, W. **Colloids Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects**, 183-185, 681-688, 2001.

MOILLIET, J.L.; COLLIE, B., BLACK, W. The physical chemistry, technical applications and chemical constitution of synthetic surface active agent. **Surface activity**. 2<sup>a</sup> ed. Londres: E. & F. N. Spon Ltd. (Ed.), p. 248-258, 1961.

MORAIS, J.M.; SANTOS, O.D.H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R.A.; ROCHA-FILHO, P.A. Physicochemical characterization of canola oil/ water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2006a.

MORAIS, J.M.; SANTOS, O.D.H.; DELICATO, T.; ROCHA-FILHO, P.A. Canola oil/ water nano-emulsions: Physicochemical characterization and evaluation of electrolytes influence on emulsion stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, n. 7, 2006b.

MORALES, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; GARCIA CELMA, M.J.; SOLANS, Y.C. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/ water nano-emulsion formation. **Langmuir**, v. 19, p. 7196-7200, 2003.

MORETTO E.; FETT R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria alimentícia**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MORRISON, I.D.; ROSS, S. Emulsions. **Colloidal dispersions- Suspensions, Emulsions and Foams**, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 420-455, 2002.

MURILLO, G.; PEREZ U.; TUR, E.; VINARDELL, M.P.; GARCÍA, G.; PASCUAL, J.R. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicología**, v. 20, p. 187-192, 2003.

MURPHY, G. M., An update on photoprotection. **Journal of Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 18, p. 1-4, 2002.

NAIRN, J. G. Solutions, emulsions, suspensions and extracts, In: GENARO, A. R. (Ed) **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, 20ed Easton Mack, p. 741-744, 2000.

NASCIMENTO, R.J.S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.P.; Composição em ácidos graxos do óleo de polpa de açaí extraídos com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p. 498-502, 2008.

- NAKAJIMA, H.; TOMOSSA, S.; OKABE, M. **First Emulsion Conference**, Paris, 1993.
- NORVAL, M., Effects of solar radiation on the human immune system. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 63, p. 28-40, 2001.
- OFFORD, E. A.; GAUTIER, J. C.; AVANTI, O.; SCALETTA, C.; RUNGE, F.; KRAMER, K.; APPLGATE, L. A. Photoprotective potential of lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, San Diego, v. 32, n. 12, p. 1293-1303, 2002.
- 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*. **Dissertação** (Mestrado), Ribeirão Preto – USP, 2008.
- OOMAH, B.D.; LIANG, J.; GODFREY, D.; MAZZA, G.; **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4017-4021, 1998.
- PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SÓLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids Surface: A physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144-150, 2006
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M-C.; CHIVOT, M. **Estética cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998.
- PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões, **Cosmetic & Toiletries** (ed. Port.), v. 10, n. 6, p. 44-56, 1998.
- PONTES, M.A.N. Estudos dos subprodutos do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.): III. Obtenção do óleo e da torta, **Boletim do CEPPA**, v. 7, n. 1, p. 23- 321, 1989
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 4 ed., v.1, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 147-171, 959-1008, 1992.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2005.
- RANGEL, V.L.B.I. Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas. 1998. 138p. **Tese** (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998
- RIBEIRO, A. M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. Congresso Nacional de Cosmetologia, São Paulo, 1996. Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, p. 349- 375, 1996. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 47-53, 1996.
- RIETSCHER, R.; FOWER, J. Photocontact dermatitis. In: RIETSCHER R.; FOWER, J. Ed. **Fisher's Contact Dermatitis**, 5 ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 403, 2001

ROBERTS L. A.; XIE F.; BROOKS, B. W. The production of small monomer drops in liquid-liquid dispersions by approaching a catastrophic phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 274, p. 179-184, 2006.

ROUGIER, A.; COTTIN, M.; SILVA, O.; ROUGET, R.; CATROUX, P.; TOUFIC, A.; In vitro methods: their relevance and complementary in ocular safety assessment. **Lens Eye Toxicology Research**, v. 9, p. 229-245, 1992.

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

SAJJADI, S., JAHANZAD, F., YIANNESKIS, M., BROOKS, B. W. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance. **Industry and Engineering Chemical Research**, Washington D.C., v. 42, p. 3571-3577, 2004.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B.W. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 252, p. 27-32, 2003.

SALAGER, J.L.; FORGIARINI, A.; MARQUÉZ, L.; PENA, A.A.; PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M.P.; GONZALES, M.R. Using emulsion inversion in industrial processes. **Advanced Colloid Interface Science**, v. 108-109, p 259-272, 2004.

SALAGER, J.L.; MARQUÉZ, L.; PENA, A.A.; RONDÓN, M.; SULVA, F.; TYRODE, E. Current Phenomenological know-how and modeling of emulsion inversion. **Industry and Engineering Chemical Research**, v.39, p. 2665-2676, 2000.

SALVADOR, A.; HENRIQUES, M. D.; Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenona -3, octyldimethyl PABA and octyl methoxycinnamate in lipstick. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 25, p. 97-102, 2004.

SANCHÈZ, C.S.; GONZÁLEZ, A.M.T.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; GRANADOS, J.J.Q.; SERRANA, H.L.G.; MATÍNEZ, M.C.L.; Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p.103-107, 2007.

SANCHEZ, L.; MITJANS,M.; INFANTE, M.R.; VINARDELI, M.P; Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability, **Toxicology Letters**, v. 161, p. 53 - 60, London, 2007,

SANT' ANNA; E. S.; TÔRRES, R. C. O.; PORTO, A. C., Avaliação de diferentes métodos cromatográficos na determinação de ácidos graxos em sementes de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), **Boletim Ceppa** v.19, n.1, p.84-94, Curitiba, 2001.

SANTOS, E.P.; FREITAS, Z.M.; SOUZA, K.R.; VERGNANINI, A. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetics Sciences**, v. 21, p. 1-5, 1999.

SANTOS, O.D.H. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido. Ribeirão Preto. **Tese** (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. p. 25, 2006.

SASSON, C. S. Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol. **Dissertação** (Mestrado). Departamento de Farmácia – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHAUDER, S.; IPPEN, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreen. **Contact Dermatitis**, v. 37, p. 221-232, 1997.

SCHULLER E ROMANOWISKI, The ABCs of SPFs: an introduction to Sun protection products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 114, p. 49 – 57, 1999.

SHAATH, N.A. The chemistry of sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, v. 10, n. 3, p. 55 - 70, 1986.

SHINODA, K.; HANRIN, M.; KUNEIDA, H.; SAITO, H. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdã, v.2, p. 301 -314, 1981.

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.

SIGMA-ALDRICH. **Catálogo on line de Produtos**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail>, capturado dia 11 de junho de 2008.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94 -103, 1999.

SIMÕES, CM. & SPITZER, V. Óleos essenciais. In: Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, p. 387-415, 1999

SIMOVIC, S.; TAMBURIC, S.; MILIC-ASKRABIC, J.; RAJIC D. An investigation into interactions between polyacrylic polymers and a non-ionic surfactant: an emulsion preformulation study. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 184, p. 207-217, 1999.

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A.; USÓN, A.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N., In: MITTAL, K.L.; SHAH, D.O. (Eds), **Adsorption and Aggregation of surfactants in solution**, New York: Marcel Dekker, v.19, p. 525, 2005.

SOLÉ, I; MAESTRO, A.; PEY, C.M.; GONZÁLEZ C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Nano- emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 138-143, 2006.

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.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; DE SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology In vitro**, v. 13, p. 375–384, 1999.

STEINBERG, D. Regulation in Chemicals, Sunscreen Labeling and Nanotechnology. **Cosmetics and Toiletries**, 2007.

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

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

TADROS, T.F.; BECKER, P. **In Encyclopedia of Emulsion Technology**, Ed: Marcel Dekker. New York, v. 1, p. 129-285, 1983.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICH, L.; BOUTET, T.; DEVERRE, J. R. ; BENITA, S. ; COUVEUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cell in ascite. **Journal of Controlled Release**, vol. 89, n. 3, p. 473 – 482, 2003.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicron cationic emulsion as a new delivery system for oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, p. 30-36, 1999.

TREGUIER, J.P.; LO.P., SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions et diagrammes eau-surfactil-huile Etude d'un système eau. Brijs 92 et 96- huile de vaseline influence de l'hydrophile du surfactil. **Pharm Acta Helv**, v. 50, p. 421-431, 1975.

TRINDADE, T. **Nanotecnologia: um admirável mundo novo**, Universidade do Porto, Portugal, 2007

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

VASCONCELLOS, J.A. **Alimentos funcionales: conceptos y beneficios para la salud. The World of Food Science**. Disponível em: [http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos\\_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm](http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm). Acesso em: 12 jul. 2007

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



VINARDELL, M.P.; GARCIA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p.551-556, 2000.

VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation by commonly used laboratory solvents. **Toxicology In Vitro**, v.20, p. 1066-1070, 2006.

VIVES, M. A.; MACIÁN, M.; SEGUER, J.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Irritancy potential induced by surfactants derived from lysine. **Toxicology in Vitro**, v. 11, p. 779-783, 1997.

VORAUER-UHL, K.; FÜRNSCHLIEF, E.; WAGNER, A.; FERKO, B.; KATINGER, H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14(1), p 63-67, 2001.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid, Diaz dos Santos, 1990. cap.15, p. 249 – 293: Productos protectores solares, bronceadores, antiqumeaduras solares, 1990.

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

WRIGHT, T. I.; SPENCER, J. M.; FLOWERS, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 54, n. 6, p. 933-946, 2006.

XIE, F.; BROOKS, B. W. Phase behaviour of a non-ionic surfactant-polymeric solution-water system during the phase inversion process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 252, p. 27-32, 2004

XU, C.; GREEN, A.; PARISI, A.; PARSONS, P. G. Photosensitization of the sunscreen octyl p-dimethylaminobenzoato by UVA in human melanocytes but not in keratinocytes. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 73, p. 600-604, 2001.

YU L.;L.; ZHOU, K.; K.; PARRY,J.; Antioxidant properties of cold-pressed black caraway,carrot, cranberry, and hemp seed oils. **Food Chemistry**, v. 91, p. 723–729, 2005.

ZANATTA, C. F. Aplicação do óleo de buriti no desenvolvimento de emulsões e estudo da citotoxicidade e potencial fotoprotetor em cultivo celular. **Tese (Doutorado)**, Ribeirão Preto – USP, 2008.

ZANATTA, C.F.; CUEVAS, E.; MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P. Determination of Anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, American Chemical Society**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, 2005.

ZERFA, M.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Phase behavior of polymer emulsions during the phase inversion process in the presence of non ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam , v. 178, p. 41-48, 2001.