

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
MESTRADO PROFISSIONAL

SARAH LEDUR SELBACH

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE UMA
NANOEMULSÃO DE USO TÓPICO**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

SARAH LEDUR SELBACH

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
UMA NANOEMULSÃO DE USO TÓPICO**

Dissertação de mestrado desenvolvida com a finalidade de obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica pelo PPGBF-PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz, Ph.D.

Co-orientadora: Prof^a Dra. Temis Furlanetto Corte

Porto Alegre, 2017.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Kreutz, e à FK Biotecnologia pelo patrocínio do projeto, que viabilizaram a concretização deste sonho, e aos meus colegas de trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dra. Temis Furlanetto Corte, pelo apoio incrível para que esse projeto se concretizasse.

À professora Marlise dos Santos que me inspirou a ingressar nesta caminhada.

Aos alunos queridos e dedicados que me auxiliariam. Pedro Vargas, Viviane Spetch Iuppen e Paula Escobar, vocês são pessoas muito especiais que cruzaram meu caminho. À doutoranda Elisa Magno e aos professores (Dr. Papaleo e Dr. Adriano) do laboratório de física 96A do Tecnopuc, pelo apoio na caracterização das nanoemulsões.

À professora Ana Paula Duarte e a seus bolsistas Juliana e Edeamar.

Aos laboratoristas Alex e Andressa, e ao Eduardo Pedrazza, pela paciência.

Aos meus amigos pelo apoio e paciência, em especial à Alana Carina Klein pelo suporte psicológico e intelectual.

A minha família querida, que sempre acredita em mim e me leva a ir além. Em especial à prima Nati pelas correções.

Por último, porém não menos importante, quero agradecer aos meus pais Cristiano e Anete pelo apoio incondicional, não só agora, mas por toda vida.

“Vencedor não é aquele sempre vence, mas quem nunca para de lutar.”

Autor desconhecido

“Viva como se você fosse morrer amanhã. Aprenda como se você fosse viver para sempre.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), o câncer de pele possui a maior incidência mundial e seus casos vêm aumentando exponencialmente. O aumento do índice ultravioleta devido à diminuição da camada de ozônio e a exposição solar excessiva contribuem para este fato. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), se dá por fatores endógenos e exógenos, principalmente pela exposição aos raios ultravioleta (UV). Esta está diretamente ligada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, especialmente o de pele. As EROs, ou radicais livres, alteram o DNA e demais biomoléculas da pele, ocasionando mutações genéticas que favorecem e induzem a incidência de câncer, e causam fotoenvelhecimento. Conseqüentemente, a busca de novos ativos com propriedades antioxidantes de uso tópico é de extrema importância para a prevenção de fotodanos e câncer de pele. Este projeto de mestrado teve como objetivo desenvolver uma nanoemulsão tópica contendo estas substâncias ativas, Chá Verde (*Camellia sinensis*) e Óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa*), que apresentam propriedades antioxidantes, estudar sua estabilidade e avaliar *in vitro* suas propriedades. Como resultado, espera-se obter um insumo cosmético que atenda uma demanda do mercado de consumidores, contribuindo para prevenção do câncer de pele e para diminuição dos sinais do fotoenvelhecimento cutâneo.

Palavras chave: Nanoemulsão, Óleo de buriti, Chá verde, Pele, Antioxidante Radicais livres.

ABSTRACT

According to INCA (National Institute of Cancer) the cases of skin cancer are increasing exponentially, and it is the world's largest incidence. The increase in ultraviolet index, due to the depletion of the ozone layer, and excessive sun exposure contribute to this fact. The formation of reactive oxygen species (ROS) can be from endogenous and exogenous factors, mainly by exposure to ultraviolet (UV). This are directly linked to the development of several types of cancer, especially skin cancer and photoaging. ROS or free radicals alter the DNA and other biomolecules of the skin, causing genetic mutations that promote and induce cancer incidence. Consequently, the search for new antioxidant substances for topical use is of utmost importance for the prevention of photodamage and skin cancer. This project of master dregree aims to develop a topical nanoemulsion containing these active substances Green tea (*Camellia sinensis*) and Buriti Oil (*Mauritia flexuosa*), which have antioxidant properties, and to study their stability *in vitro* and assess its properties. As a result it is expected to develop a cosmetic raw material that meets a demand of the consumer market, contributing to the prevention of skin cancer and to decrease the signs of cutaneous photoaging.

Keywords: Nanoemulsion, Buriti oil, Green tea, Skin, Antioxidant, Free radical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Elementos da pele (MARTINI, 2009).....	14
Figura 2. Corte histológico demonstrando as camadas da epiderme (TORTORA, 2012)...	15
Figura 3. Comparação da penetração da radiação com diferentes comprimentos de onda na pele humana (BRYAN, 2014).	18
Figura 4. Geração de EROs a partir da redução do oxigênio molecular na reação de fosforilação oxidativa (SALVADOR ; HENRIQUES, 2004).....	20
Figura 5. Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões O/A e A/O (FORGIARINI et. al., 2001).....	24
Figura 6. Homogeneização final da nanoemulsão, após adição do extrato de Chá Verde. .	38
Figura 7. Estabilidade das emulsões testadas para determinação do EHL do Óleo de Buriti..	45
Figura 8. Demonstrativo de cálculo de porcentagem de cremeado (MARUNO, 2009).....	46
Figura 9. Gráfico demonstrativo da variação não significativa dos valores de pH inicial e final.	51
Figura 10. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial.....	52
Figura 11. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial.....	52
Figura 12. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial.....	52
Figura 13. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.	53
Figura 14. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.	53
Figura 15. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.....	53
Figura 16. Variação do tamanho da partícula das triplicatas no dia inicial e depois de 28 dias de estabilidade acelerada.	55

Figura 17. Variação do tamanho da partícula entre os lotes de triplicata da nanoemulsão.	55
Figura 18. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV), evidenciando a morfologia da nanoemulsão Escala 200nm, aumento de 130.000x.....	57
Figura 19. Percentual de inibição do radical DPPH das amostras de nanoemulsão e branco em 10%, 30% e 50%.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração em % e p/p de tensoativo lipofílico e hidrofílico utilizado para obtenção do EHL requerido.....	33
Tabela 2. Composição das emulsões para determinação do valor de EHL requerido do Óleo de Buriti	33
Tabela 3. Formulações teste realizadas.....	35
Tabela 4. Valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti na nanoemulsão.	46
Tabela 5. Percentual de cremação das emulsões testadas para determinação do EHL do Óleo de Buriti.....	46
Tabela 6. Valores iniciais, finais e médios de pH por lote de nanoemulsão.	50
Tabela 7. Análise comparativa dos tamanhos das partículas e polidispersão das triplicatas das nanoemulsões.....	54
Tabela 8. Variação do potencial zeta do dia inicial 28 dias após estabilidade acelerada das triplicatas da nanoemulsão.	56

LISTA DE ANEXO

Anexo 1. Certificado de análise do óleo de burtiti	72
Anexo 2. Certificado de análise do Chá Verde	73

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
AP-1	<i>Activator protein</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
C	Catequina
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPDs	Ciclobutano pirimidinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
EHL	Equilíbrio hidrofílico lipofílico
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GC	Galato catequina
GSH	Glutathiona reduzida
GSH – Rd	Glutathiona redutase
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
IFSCC	<i>International Federation of Societies of Cosmetics Chemist</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNos	Indutor de oxido nitro sintase
ISO	<i>Internatinal Standart Sistem</i>
JKN	<i>Junamino terminal kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDA	Malonaldeído
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP-1	Colagenase
MMPs	Metaloproteinases

mV	Milivoltz
NF-kb	<i>Fator nuclear kappa B</i>
nm	nanômetros
O/A	Óleo em água
O ₂	Oxigênio
P.A.	Padrão analítico
P/P	peso/ peso
Pdi	Índice de polidispersão
pH	potencial hidrogênico
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i>
ROS	<i>Reactive oxigen species</i>
RUV	Radiação ultravioleta
SOD	Superóxido dismutase
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	A pele.....	14
2.2	Efeitos da radiação ultravioleta na pele	17
2.3	Antioxidante endógenos e Espécies reativas de Oxigênio	19
2.4	Atividade antioxidante.....	22
2.5	Emulsões	23
2.6	Nanotecnologia e Nanocosméticos.....	24
2.7	Nanoemulsões	25
2.7.1	Métodos de preparo de nanoemulsões	25
2.7.2	Vantagens das nanoemulsões	26
2.8	Chá Verde (<i>Camellia Sinensis</i>).....	27
2.9	Óleo de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Desenvolvimento da nanoemulsão	31
4.1.1	Determinação do valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti	32
4.1.2	Obtendo as nanoemulsões	34
4.1.3	Método de preparo das formulações	37
4.2	Caracterização da formulação	38
4.2.1	Determinação do valor de pH.....	38
4.2.2	Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta	38
4.2.3	Avaliação morfológica.....	39
4.2.4	Teste de Estabilidade	40
4.2.5	Avaliação das propriedades da formulação.....	42
4.6	Análise estatística dos resultados	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Desenvolvimento da nanoemulsão	45
5.1.1	Determinação do valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti	45
5.1.2	Obtendo as nanoemulsões	47
5.1.2.5	Método de preparo das formulações	50

5.2	Caracterização da formulação	50
5.2.1	Determinação do valor de pH	50
5.2.2	Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta	51
5.2.3	Avaliação morfológica	56
5.2.4	Teste de estabilidade	57
5.2.5	Avaliação das propriedades da formulação	59
6	CONCLUSÃO.....	61
7	REFERENCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A pele possui características hidrofílicas (epiderme e derme) e lipofílicas (estrato córneo). Por esse motivo, as emulsões são os principais veículos empregados pela indústria cosmética, pois permitem a veiculação de substâncias ativas e/ou fármacos lipofílicos e hidrofílicos em uma mesma formulação (MARTINI, 2009). Além disso, dependendo das características estruturais desses sistemas é permitida a veiculação de substâncias ativas, ou fármacos encapsulados, ou de diâmetro reduzido, que permitem a penetração dos mesmos em camadas mais profundas da pele, o que pode trazer inúmeros benefícios (FRONZA, 2007). A capacidade de controlar diferentes estruturas e tamanhos de ativos é extremamente importante para adequar o produto às necessidades exigidas pela via de administração e ao efeito desejado de um produto cosmético e/ou farmacêutico (TARDOS *et al.*, 2004).

As nanoemulsões são emulsões contendo ativos/e/ou fármacos em glóbulos de tamanho reduzido em relação aos ativos e/ou fármacos de emulsões regulares, o que permite inúmeras vantagens ligadas a características organolépticas, estabilidade físico-química e ação dermatológica (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ, 2004).

A radiação ultravioleta (UV) é responsável pelos maiores danos causados à pele: ao penetrarem na epiderme e derme, os raios geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar mutações genéticas decorrentes de falhas nos mecanismos naturais de proteção contra radiação ultravioleta (COUTEAUET *al.*, 2001). Atualmente, antioxidantes oriundos de produtos naturais têm sido buscados para uso tópico com o objetivo de diminuir danos oxidativos. Alguns óleos e extratos vegetais têm potencial antioxidante comprovado, por prevenirem reações de oxidação biológica e reduzirem a formação de radicais livres. O uso dessas substâncias ativas em tamanho nanométrico otimiza suas propriedades e principalmente a penetração até a camada basal da epiderme, onde elas podem auxiliar indiretamente nos mecanismos de proteção natural da pele, combatendo os radicais livres, impedindo danos celulares severos e melhorando as condições gerais da pele (FRONZA *et al.*, 2007). Dentro dessa perspectiva, neste estudo foi desenvolvida uma nanoemulsão contendo substâncias ativas de origem vegetal com propriedades antioxidantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PELE

A pele é um órgão complexo que envolve nosso corpo, atuando como uma barreira ativa entre o organismo e o meio ambiente (BOWSTRA *et al.*, 2003). 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; BAREL *et al.*, 2014). Possui, juntamente com os anexos cutâneos, funções de proteção mecânica, regulação térmica, permeabilidade seletiva e absorção (NASH *et al.*, 2007).

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

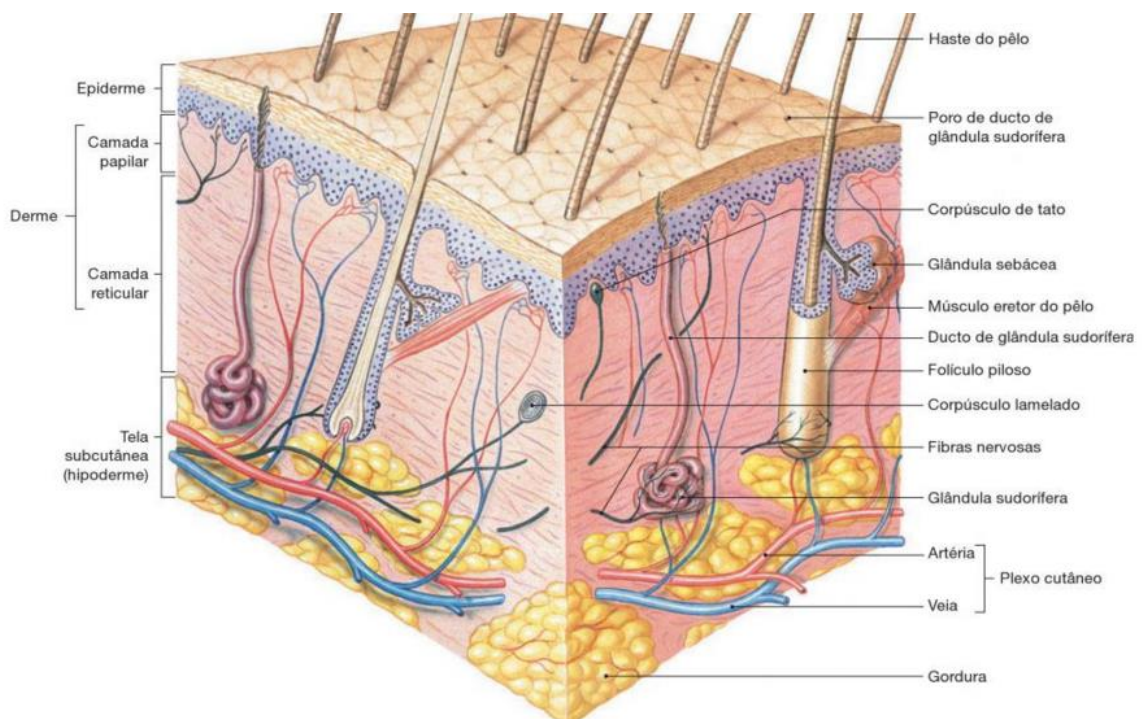


Figura 1: Elementos da pele (MARTINI, 2009).

A epiderme é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo a camada mais externa do tecido cutâneo (KIM *et al.*, 2007). A epiderme é subdividida

em quatro camadas principais, sendo a mais externa o estrato córneo; abaixo desta, localiza-se o estrato granuloso, seguido pelo estrato espinhoso e pela camada mais interna, a camada basal ou germinativa. A epiderme humana não possui vasos sanguíneos e se renova inteiramente a cada 20 dias ou 30 dias (MARTINI, 2009).

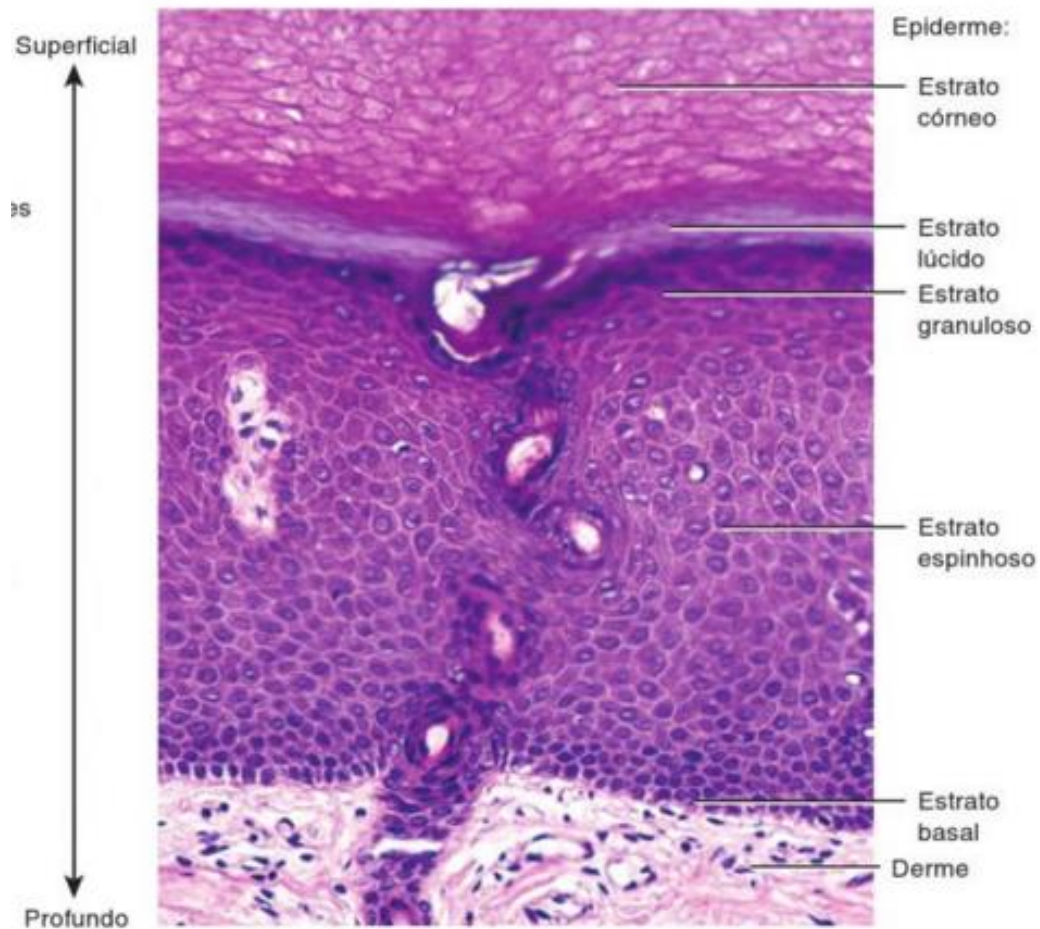


Figura 2. Corte histológico demonstrando as camadas da epiderme (TORTORA, 2012).

O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, tem função protetora e permeabilidade seletiva, retendo água, proteínas e eletrólitos e impedindo a entrada de agentes agressores exógenos (TOLEDO, 2004). Tal camada é formada por queratina, uma proteína insolúvel, que é transportada até a camada superficial por meio do processo de queratinização ou corneificação, transformação dos queratinócitos (células hexagonais da camada basal) em células córneas mortas devido ao deslocamento permanente desta camada de células para superfície através da sua renovação na camada basal (MARTINI, 2009; TORTORA, 2012).

Localizado abaixo do estrato córneo, o estrato granuloso apresenta grânulos arredondados de querato-hialina (proteína que auxilia a agregação da queratina em filamentos paralelos) que contêm aminoácidos ricos em enxofre e pequenos corpos

lamelados esféricos eletrodensos de (50 a 100 nm) denominados Corpúsculos de Odland (ODLAND, 1981), ou queratinossomas que formarão o cimento intercelular do estrato córneo (HEATH, YOUNG, 2001). É a camada mais superficial em que as células ainda possuem núcleo (MENON, 2002).

O estrato espinhoso é formado por cinco a dez camadas de células com citoplasma amplo e desmossomos responsáveis pela grande coesão celular dos epitélios. A camada espinhosa produz substâncias impermeáveis que dificultam a passagem de compostos presentes no interior do nosso corpo, ocorrendo o mesmo para o exterior, sobretudo no que se refere à água (MENON 2002; TORTORA, 2012).

O estrato basal ou germinativo é a camada mais interna da epiderme e é composto por milhares de células de dois tipos principais: os melanócitos (que produzem melanina, responsável pela coloração da pele e proteção contra radiação ultravioleta) e os queratinócitos que se renovam diariamente. Essas células são nutridas por vasos sanguíneos localizados na derme (KIM *et al*, 2007; MARTINI, 2009; TORTORA, 2012; BRYAN, 2014). Conforme chegam à superfície, os queratinócitos sofrem modificações graduais em seu formato e composição química, tornando-se anucleadas quando atingem a camada córnea, superfície da epiderme, e se desprendem já mortas, por isso tem intensa atividade mitótica, promovendo a rápida renovação celular, compensando assim a descamação constante do estrato córneo (NASH, 2007; MARTINI 2009; TORTORA, 2012).

Além dos melanócitos e queratinócitos, são encontrados na epiderme:

- *Células de Langherans*: tem função imunológica nos estratos intermediários;

- *Células de Merckel*: localizadas no estrato basal ou germinativo, têm a função sensorial, pois possuem terminações nervosas sensitivas que se ligam às fibras do sistema nervoso central (LEONARDI, 2000; TORTORA, 2012).

A derme é um tecido conjuntivo denso constituído por células e abundante matriz extracelular. Suas funções são a sustentação e a nutrição da epiderme (PEYREFITTE *et al.*, 1998; MARTINI, 2009; BRYAN, 2014). Neste tecido de sustentação estão presentes inúmeros vasos e nervos, nos quais estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos, estruturas sensoriais e unhas. A derme é considerada um verdadeiro “reservatório” de água, capaz de armazenar, trocar e fornecer variadas quantidades de água em função das necessidades do organismo (PEYREFITTE *et*

al., 1998; TORTORA 2012; BRYAN, 2014).

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, e as células migratórias consistem em células que participam da defesa do organismo (BRYAN, 2014; PEYREFITTE *et al.*, MARTINI, CHIVOT, 1998; MARTINI, 2009). A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina inseridas na substância fundamental, material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas, como ácido hialurônico, glicosanimoglicanos e glicoproteínas de estrutura (TORTORA, 2012,;VIGLIOGLIA, 1989).

De acordo com sua composição a derme 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), composta por finas fibras de colágeno (reticulina) e elásticas que são fixadas à junção dermo epidérmica, estando ambas organizadas em redes frouxas (TORTORA, 2012). Além disso, possui capilares sanguíneos, linfáticos e numerosas terminações nervosas, realizando trocas nutritivas com as camadas mais profundas da epiderme. A derme reticular, por sua vez, é o tecido de sustentação compressível, extensível e elástico da epiderme, constituída por tecido conjuntivo denso e fibras de colágeno que formam feixes cada vez mais espessos em função da profundidade e entrelaçadas às fibras elásticas (BAUMANN, 2000; BRYAN, 2014; PEYREFITTE *et al.*,1998).

A hipoderme, camada mais profunda da pele, também é conhecida como camada subcutânea de gordura. Formada por tecido adiposo, 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 (BRYAN, 2014; PEYREFITTE *et al.*, 1998). Apresenta ainda como funções a proteção mecânica, pois se comporta como verdadeiro amortecedor que atua suavizando traumas, e a de isolante térmico, conservando a temperatura corporal (MARTINI, 2009; TORTORA, 2012; VIGLIOGLIA, 1989).

2.2 EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA PELE

A radiação ultravioleta (RUV), por sua vez, se divide em três regiões espectrais: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (EPSTEIN *et al.*, 1990). A exposição crônica ou aguda à radiação ultravioleta é a principal responsável pelos fotodanos cutâneos. A região UVC possui energia elevada associada ao seu menor comprimento de

onda, é altamente lesiva ao homem, com efeitos carcinogênicos e mutagênicos, porém é absorvida pela camada de ozônio em sua maioria, de tal forma que a quantidade dessa radiação que atinge a população é muito pequena (MURPHY, 2002; GRUIJL *et al.*, 2001; NORVAL,2001).

Sua exposição crônica pode estar relacionada ao aumento do risco de câncer de pele, fotoenvelhecimento, cataratas e outras doenças oftalmológicas, além de afetar o sistema imune (BRYAN, 2014; MURPHY, 2002; GRUIJL *et al.*, 2001; NORVAL, 2001). As radiações que atingem a pele humana variam de acordo com seu comprimento de onda, conforme pode ser observado na Figura 3.

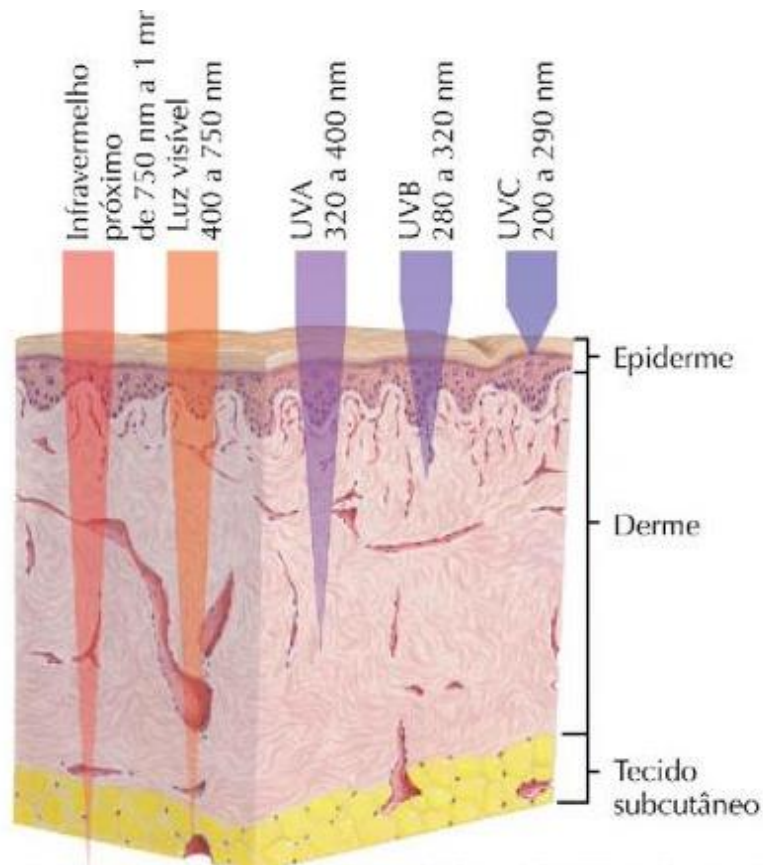


Figura 3. Comparação da penetração da radiação com diferentes comprimentos de onda na pele humana (BRYAN, 2014).

A radiação UVA, de maior comprimento de onda, tem menor energia e é 600-1000 vezes menos eritematogênica que a radiação UVB, porém penetra mais profundamente na pele atingindo a derme. É responsável pela pigmentação da pele e, além disso, origina radicais livres oxidativos, responsáveis pelo envelhecimento cutâneo precoce (fotoenvelhecimento ou envelhecimento actínico), por doenças de fotossensibilidade e também está associada a

alterações que causam o câncer (BRYAN, 2014; MASSON *et. al.*, 2003; MEYBEC, 1983). Tais alterações ocorrem pela captura de fótons da radiação UVA por fotosensibilizantes endógenos, como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos que, ao serem capturados, excitam estas moléculas e transferem energia para o oxigênio molecular, conduzindo à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecidos como radicais livres (COUTEAU *et al.*, 2001).

A radiação UVB tem menor comprimento de onda e menor poder de penetração na pele que a radiação UVA, é intensamente absorvida pela epiderme e é mais energética. A alta energia é responsável pelos danos agudos e crônicos à pele, tais como eritema, pigmentação, descamação, e principalmente alterações que induzem o câncer cutâneo (MARTINI, 2009; MENDONÇA *et. al.*, 1996). A energia da radiação UVB induz diretamente a lesões às moléculas de DNA e também pode gerar EROs (BRYAN, 2014; COUTEAU *et al.*, 2001). Devido a sua menor penetração na pele, atinge apenas os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans (BRYAN, 2014). Os fótons de luz ultravioleta interagem com o DNA celular, ocasionando uma série de efeitos específicos e não específicos. Essas interações podem resultar em fotoprodutos de DNA, formados nas bases dos nucleosídeos de pirimidina adjacentes em uma cadeia de DNA. Uma mutação comum dos dímeros de pirimidina ciclobutano é altamente específica para os danos causados pela radiação ultravioleta. Esses fotoprodutos causam diminuição da replicação do DNA, mutagênese e carcinogênese (BRYAN, 2014).

Os efeitos nocivos da radiação solar podem ser divididos em agudos e graves. São efeitos agudos: eritema solar, reações de fotossensibilização induzida por substâncias químicas, agravamento de doenças e alergias. São considerados efeitos crônicos o fotoenvelhecimento da pele, o câncer de pele e a diminuição da imunidade cutânea (FITZPATRICK *et. al.*, 1974; TORTORA, 2012).

2.3 ANTIOXIDANTE ENDÓGENOS E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As espécies reativas de oxigênio são altamente reativas devido a configuração eletrônica do oxigênio que tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários reativos, destacando-se o ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Os radicais livres podem se formar a partir de processos oxidativos biológicos, como a fosforilação oxidativa (**Figura 4**), 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 quatro elétrons, reduzindo-se até formar água. Do oxigênio consumido, cerca de 2 a 5% não é reduzido completamente, 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).

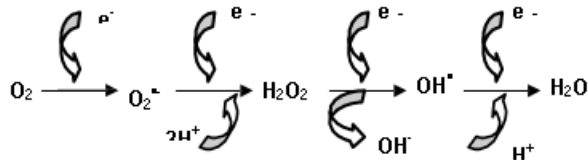


Figura 4. Geração de EROs a partir da redução do oxigênio molecular na reação de fosforilação oxidativa (SALVADOR ; HENRIQUES, 2004).

Além de formados naturalmente através do metabolismo humano, podem ser gerados a partir de causas exógenas como: 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 *et al.*, 2006).

Para atenuação destas espécies reativas de oxigênio formadas fisiologicamente e provenientes de fontes externas, o corpo desenvolve mecanismos de defesa, conhecidos como antioxidantes, que protegem contra o ataque desses radicais livres (KAUR *et al.*, 2007). Dentre os antioxidantes presentes naturalmente nas células da pele estão a superóxido dismutase, catalase, tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona e glutatona. Os antioxidantes endógenos celulares podem atuar de duas maneiras: como detoxificadores do agente oxidante antes que ele cause lesão, como é o caso da glutatona reduzida (GSH), do superóxido-dismutase (SOD), da catalase, da glutatona-peroxidase (GSH-Px) e da vitamina E. O outro mecanismo de ação se dá recuperando as lesões já ocorridas, como é o caso do ácido ascórbico, da glutatona-redutase (GSH-Rd) e da GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS, 1991). Porém, essas defesas antioxidantes endógenas são facilmente saturadas, sendo muitas doenças de pele caracterizadas por uma deficiência na capacidade antioxidante (KAUR *et al.*, 2007).

As principais biomoléculas atingidas pelas EROS são açúcares, proteínas, ácidos nucleicos e, especialmente, os lipídeos, sendo este último o mais suscetível, pois as

membranas biológicas contêm consideráveis quantidades de lipídeos altamente insaturados e em contato com fluídos ricos em oxigênio e metais (INAL *et. al.*, 2003).

A primeira alteração induzida pela exposição solar na pele é a inflamação, caracterizada por eritema, edema e calor. As células inflamatórias irão produzir EROs e causar alterações nos lipídeos, proteínas e DNA, promovendo diversos receptores de membrana para mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α (*Fator de necrose tumoral- alfa tumor necrosis factor-alpha*) e interleucinas (IL-1 e IL-6). Estas citocinas liberadas pela exposição à radiação UV estimulam a sinalização intracelular de fatores de transcrição como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), p38, *c-Jun amino terminal kinase* (JKN), e NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*) que influenciam potencialmente a sobrevivência celular (MUTHUSAMY *et. al.*, 2010). Além de estimular *activator protein 1* (AP-1), que induz metaloproteinases (MMPs), responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas da pele, especialmente colagenase 1 (MMP-1), causando foto envelhecimento (FISHER, 1997). Esses fatores de transcrição são importantes na regulação de diversos genes envolvidos na patogênese da inflamação (iNOS – inducible nitric oxide synthase), COX-2 (ciclo-oxigenase-2), na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose. As alterações dos mediadores inflamatórios associadas à alteração da expressão dos genes podem promover o fotoenvelhecimento e, principalmente, o câncer de pele (GUARATINI *et al.*, 2009). As pirimidinas sofrem modificações fotoquímicas, resultando em dímeros de ciclobutano e demais subprodutos que são reparados, que são reparados, fisiologicamente, por enzimas específicas. ABC excinuclease, DNA polimerase I e DNA ligase (FISCHER, 1997).

Outra alteração causada pelas espécies reativas de oxigênio é a indução da peroxidação de ácidos graxos que pode causar a conversão de vários deles em hidroperóxidos. Um dos produtos formados a partir destas reações é o malonaldeído (MDA), composto reativo que pode atacar grupamentos amino de proteínas e fosfolipídios, modificando moléculas biológicas, podendo associar-se à autoimunidade (BRYAN, 2014; REZING, 1996).

Dentre as mutações genéticas causadas pela exposição crônica à radiação ultravioleta a mais significativa ocorre no gene supressor de tumor p53, que devido ao estresse oxidativo, sofre danos em sua função de manutenção da integridade genômica, por bloquear a replicação do DNA em resposta a danos, ou induzir seu reparo, reduzindo sua capacidade em disparar a morte programada de células (apoptose), resultando em maior proliferação celular (BRYAN, 2014; HECK, 2004).

Sugere-se ainda que, independentemente dos danos causados ao DNA, o desequilíbrio redox provocado pela radiação UV possa interferir na apoptose. Assim, os efeitos deletérios

da radiação UV na pele são cada vez mais evidentes (HECK, 2004). Tendo em vista a prevenção ou terapias para o câncer de pele, que é um dos tipos de câncer de maior ocorrência, são muito discutidos mecanismos para o restabelecimento do equilíbrio redox, sendo que o uso de antioxidantes nesses casos é uma alternativa.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato. O mecanismo de ação dos antioxidantes é pode ocorrer pela remoção do oxigênio do meio, varredura dos RLs, sequestro dos metais catalizadores da formação de RLs, aumento da geração de antioxidantes endógenos, *scavenger*, quando ele age transformando um RL em outro menos reativo, ou *quencher*, quando consegue neutralizar completamente o RL através da absorção de toda a energia de excitação, ou também a interação de mais de um mecanismo (KAUR *et. al.*, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura do agente antioxidante. Ainda conforme a ação sobre os RLs, o antioxidante pode ser denominado de *scavenger*, quando ele age transformando um RL em outro menos reativo, ou *quencher*, quando consegue neutralizar completamente o RL através da absorção de toda a energia de excitação (HALLIWELL, 1995).

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, um exemplo é a super óxido desmutase (SOD) que atua transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, possui meia vida curta (menos de 10 min) (WRIGHT, SPENCER, FLOWERS, 2006). Além dela possuímos no corpo humano outros antioxidantes enzimáticos, como a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (ROSS, 1991).

Muitos desses mecanismos, porém, são inibidos pela luz UV e pela luz visível. De fato, a exposição à luz UV causa aumento da formação de radicais livres (CASAGRANDE *et al.*, 2006; FREI, HIGDON, 2003; WRIGHT, SPENCER, FLOWERS, 2006).

Os danos causados à pele pela radiação UV são, em parte mediados pelos intermediários do oxigênio reativo. Logo, os antioxidantes podem ser particularmente úteis nas alterações da pele induzidas pela radiação UVA que, acredita-se, que sejam 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, otimizando a ação de fotoprotetores (CASAGRANDE *et al.*, 2006; FREI, HIGDON, 2003; WRIGHT, SPENCER, FLOWERS, 2006).

Existe hoje uma grande demanda para produtos cosméticos com antioxidantes, de modo que testes devem ser feitos para comprovar a atividade proposta nesses produtos. 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.

2.5 EMULSÕES

As formulações dermatológicas têm como principal desafio a penetração e liberação de seus princípios ativos na pele de forma eficaz para a realização de seu efeito desejado, cuidando, porém, para não induzir alterações irreversíveis significantes no tecido cutâneo. As principais preparações de uso dermatológico são os sistemas emulsificados, devido a vantagens que oferecem sob o ponto de vista farmacêutico (SMITH, MALBACH, SURBER, 2000). Um dos veículos de grande utilização para fármacos e ativos cosméticos são as emulsões fluídas e semi-sólidas.

Emulsões são sistemas heterogêneos termodinamicamente instáveis, estabilizados cineticamente (FERNANDEZ *et al.*, 2004), consistindo de pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso em outro na forma de glóbulos (BECHER, 1965). Não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem de condições termodinâmicas, modo de preparo, características de cada componente e da ordem de adição dos mesmos (PORAS *et al.*, 2004; ESQUENA, SOLANS, 1998). São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo, cujas propriedades físico-químicas influem drasticamente no comportamento do sistema (SAJJADI; ZERFA, BROOKS, 2003). A estrutura das emulsões consiste em gotículas de fase dispersa (ou interna) envolvidas por uma fase contínua (fase externa). Podem ser classificadas como água em óleo (A/O), quando gotículas da fase aquosa estão dispersas em uma fase oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas em numa fase contínua aquosa, conforme representado na figura 5.

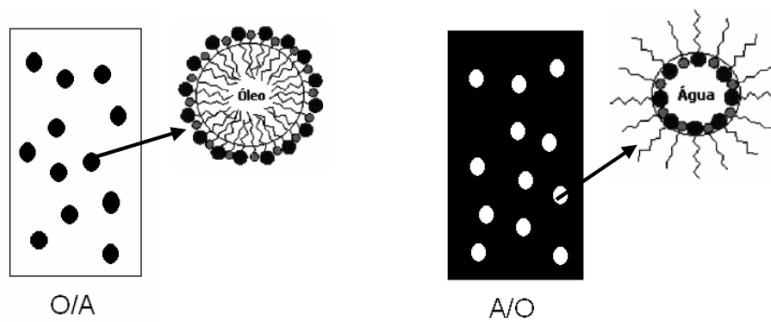


Figura 5. Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões O/A e A/O (FORGIARINI *et. al.*, 2001).

2.6 NANOTECNOLOGIA E NANOCOSMÉTICOS

De acordo com o relatório emitido pela The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004), a nanociência é a área que se dedica ao estudo do fenômeno e à manipulação de materiais nas escalas atômica, molecular e macromolecular, cujas propriedades diferem significativamente daquelas em escalas maiores. Um nanômetro equivale a um fator de 10^{-9} do metro, ou um bilionésimo do metro. Esse tamanho é aproximadamente cem mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo, e setecentas vezes menor do que um glóbulo vermelho encontrado no sangue humano (ABDI, 2010).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª Edição (1988), fármaco é substância ativa, droga, insumo farmacêutico ou matéria-prima empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos em benefício da pessoa à qual se administra. Os produtos cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2000). Desta forma, podemos entender que as definições de fármacos e cosméticos não são mutuamente exclusivas, sendo que um produto pode ser legalmente um cosmético, um fármaco ou ambos, fármaco e cosmético (BAREL, PAYE, MAIBACH, 2009). No que se refere à regulação, nanocosméticos e cosméticos convencionais são classificados da mesma forma: em ambos os casos, caso haja um apelo para o produto, o mesmo precisa ser comprovado através de testes para que seja passível de registro.

As vantagens do uso da nanobiotecnologia na produção de nanocosméticos e

formulações dermatológicas advêm da proteção dos ingredientes e ativos quanto à degradação química ou enzimática, do controle de sua liberação, principalmente no caso de irritantes em altas doses, e do prolongamento do tempo de residência dos ativos cosméticos ou fármacos na camada córnea (FRONZA *et al.*, 2007).

De acordo com órgãos regulatórios brasileiros, americanos e europeus, o tamanho das partículas não é determinante para avaliação da toxicidade e não existem até o momento características estabelecidas como fatores de risco para produtos nanotecnológicos.

2.7 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são emulsões especiais com glóbulos de tamanho na faixa de 20 a 500 nm (SOLANS *et al.*, 2003; NAKAJIMA, TOMAOMASA, OKABE, 1993) ou 50 a 200nm (TADROS *et al.*, 2004). Geralmente sua aparência varia de acordo com o tamanho das gotículas, nanoemulsões de 200-500nm têm tendem a apresentar uma aparência leitosa, e nanoemulsões de tamanhos menores tendem a apresentar aparência translúcida (CAPEK, 2004). Elas 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 (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ, 2004).

2.7.1 Métodos de preparo de nanoemulsões

Os métodos de preparo de nanoemulsões baseiam-se em cinco diferentes grupos:

- Auto emulsificação (RUBIN, RADKE, 1980; ELAASSER *et al.*, 1986; MILLER, 2006): ocorrendo a curvatura espontânea do filme tensoativo entre o óleo e a água, através de reações de difusão e/ou químicas.
- Baixa energia baseada na mudança de curvatura da molécula do tensoativo (*Phase Inversion Temperature – PIT*). Este método usa as propriedades físico-químicas do sistema e utiliza a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido. Para tensoativos não iônicos, isto pode ser conseguido pela mudança de temperatura do sistema forçando a transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas. Durante o resfriamento, o sistema passa por um ponto

de curvatura zero e mínima tensão interfacial, o que predispõe à formação de gotículas finamente dispersas (FERNANDEZ *et al.* 2004). Esta técnica permite a formação de partículas de tamanho muito pequeno e com ótima estabilidade (SHINODA, SAITO, 1969; FÖRSTER *et al.*, 1995; FORGIARINI *et al.*, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2002; MORALES, *et al.*, 2003).

- Alta energia baseada no uso de dispositivo de alta rotação, alta pressão ou ultrassom. A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de deformar e quebrar as gotículas da fase interna em glóbulos menores (NAKAJIMA *et al.*, 1993; MELESON, GRAVES, MASON, 2004; LANDFESTER, EISENBLATTER, ROTHE, 2004).
- Método de difusão no solvente (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TROTTA *et al.*, 2001).
- Tratamento de uma macroemulsão sob condições de água subcrítica (KATAGI, KIMURA, ADACHI, 2007).

2.7.2 Vantagens das nanoemulsões

As nanoemulsões representam um e promissor sistema de veiculação de ativos para área de tecnologia cosmética e farmacêutica. O principal deles é a otimização da penetração dos ativos na pele até seu sítio alvo. Estudos conduzidos por Dessai (2010) e Shetty (2015) demonstram a melhor permeação e deposição de moléculas bioativas nanoestruturadas de aproximadamente 100 nm, atribuída ao aumento da penetração na pele por via transcelular (através ou entre queratinócitos) e transapêndicial (através de glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos).

Dentre as demais vantagens, podem-se citar as seguintes:

- a diminuição do tamanho dos glóbulos, associada ao movimento browniano, diminui a força da gravidade sob essas moléculas, evitando processo de instabilidade como sedimentação e cremação (TARDOS *et al.* 2004; CAPEK 2004);
- diferentemente das microemulsões que requerem concentração de tensoativo geralmente superior a 20,0%, as nanoemulsões podem ser obtidas usando

concentrações na faixa de 3,0 – 10,0% (BOUCHEMAL *et al.* 2004; IZQUIERDO *et al.* 2005);

- o pequeno tamanho dos glóbulos garante uma aplicação tópica mais uniforme sobre a pele (BOUCHEMAL *et al.* 2004);
- o pequeno tamanho dos glóbulos favorece a penetração dos ativos através de rugosidades da superfície da pele (TARDOS *et al.* 2004);
- a fluidez natural do sistema (que contém baixas concentrações de conteúdo oleoso) confere a nanoemulsões características sensoriais e estéticas únicas, podendo apresentar aparência translúcida e ser aplicada em forma de *spray* (TARDOS *et al.* 2004);
- o tamanho diminuído dos glóbulos permite que as nanoemulsões sejam esterilizadas por filtração (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004).

2.8 CHÁ VERDE (*Camellia Sinensis*)

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze é arbusto da família Theaceae conhecida popularmente por Chá Verde, chá-da-Índia, banchá ou “Green tea”. Suas folhas são ricas em compostos polifenólicos, que são substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático (LIANG *et al.*, 2001). Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonóides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRANDWILLIAM, 1995) As catequinas correspondem a, aproximadamente, 26,7% dos compostos presentes no Chá Verde, e, dentre estas, 11% são galato-3-epigalocatequina, 10% epigalocatequina, 2% galato-3-epicatequina, 2,5% epicatequina, e 15% polifenóis não identificados (SCHIMTZ *et al.*, 2005). Os principais compostos químicos terapêuticos do

material vegetal *C. sinensis*, são potentes antioxidantes de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação (FIORINI *et al.*, 2005; KALRA *et al.*, 2005), anti-inflamatórios (NAG-CHAUDHURI *et al.*, 2005); antimicrobianos (YAM *et al.*, 1997; TURCHETTI *et al.*, 2005), e podem contribuir na prevenção de câncer (HALDER *et al.*, 2005; SENGER *et al.*, 2010). Katiyar *et al.* (1994), investigaram a habilidade antioxidante das catequinas usando como marcador a ocorrência de lipoperoxidação. Nesse estudo, verificou-se que EGCG, EGC e ECG inibiram a lipoperoxidação espontânea e a induzida pela radiação UV em microsossomos de células epidérmicas de ratos. A aplicação tópica de EGCG antes da exposição à radiação UVB resultou na diminuição da produção de IL-10, o que sugere um possível mecanismo pelo qual EGCG previne a imunossupressão cutânea. Além disso, EGCG estimula a produção de IL-12, citocina que atua na prevenção da imunossupressão (KATIYAR *et al.*, 1999). O Chá Verde é um dos chás mais ricos em EGCG, que é um dos mais poderosos antioxidantes antienvhecimento e anti câncer, apresentando fortes propriedades fotoprotetoras (KHARE *et al.*, 2015).

A indução de danos ao DNA pela radiação UV se dá principalmente na forma de dímeros de ciclobutano pirimidinas (CPDs) que exercem papel essencial na indução de câncer e na imunossupressão. CPDs são formados rapidamente quando moléculas de DNA são submetidas à radiação UVB e um acúmulo desses dímeros resulta em mutações em genes críticos como o p53, o que contribui no desenvolvimento de câncer de pele. A aplicação tópica de catequinas na pele humana antes da exposição à radiação UV resultou numa inibição dose dependente da formação de CPDs. Este efeito também representa um possível mecanismo de prevenção da imunossupressão cutânea (KATIYAR *et al.*, 2000).

Embora seja uma matéria-prima muito utilizada atualmente, a Farmacopéia Brasileira (2010) não contém monografia sobre esta planta.

2.9 ÓLEO DE BURITI (MAURITIA FLEXUOSA)

O buriti (*Mauritia flexuosa*), também conhecido como coqueiro-buriti, miriti, muriti, muritim, palmeira-dos-brejos, carandá-guaçu e carnadaí-guaçu, é uma palmeira da família Palmae oriunda das regiões alagadas e úmidas do Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 1998). Rico em carotenóides, ácidos graxos e tocoferol, o que sugere boa perspectiva na utilização desse produto como alternativa terapêutica e cosmética (ROSSO, MERCADANTE, 2007), o Óleo de Buriti tem a função de lubrificar e

regenerar a barreira hidrolipídica da pele frequentemente submetida a lesões (ZANATA *et al.*, 2008). Também quando usado em produtos pós-sol, o Óleo de Buriti evita danos provocados por radiação UV, justamente por apresentar propriedades fotoprotetoras (ZANATTA *et al.*, 2010).

O Óleo de Buriti contém cerca de 1.706 ± 54 μg de carotenóides totais/g, sendo o Beta caroteno seu carotenóide principal, compondo 90% do teor total que carotenóides (GARCIA-QUIROZ *et al.*, 2003). O óleo também apresenta níveis elevados de ácido oléico (60,3%) e quantidades consideráveis de α -tocoferol (643,2 mg/g) (COSTA, 2007). A característica estrutural comum dos carotenóides é a cadeia polieno, um longo sistema de ligação dupla conjugada, que forma a “espinha dorsal” da molécula e influencia suas propriedades químicas, físicas e bioquímicas. Esta cadeia pode apresentar grupos terminais cíclicos, que apresentam substituintes contendo oxigênio. O sistema conjugado e rico em elétrons do polieno é responsável pela atividade antioxidante dos carotenóides: tanto na absorção do oxigênio singlete quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (MCNULTY *et al.*, 2008).

Conseqüentemente, tem havido grande interesse nas propriedades antioxidantes de carotenóides perante peroxidação lipídica, e a capacidade em prevenir formação de eritema epidérmica durante a exposição ao sol (STAHL, SIES, 2002). Estas características fazem deste óleo um potente ativo antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar físico quimicamente uma nanoemulsão tópica contendo extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) e Óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa*), e avaliar *in vitro* a capacidade antioxidante da formulação.

3.2 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver uma nanoemulsão tópica contendo extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) e Óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa*);
2. Determinar o valor de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) requerido para emulsificação do Óleo de Buriti;
3. Avaliar a estabilidade da formulação.
4. Caracterizar a nanoemulsão quanto ao tamanho de partículas, potencial zeta, pH e à morfologia.
5. Avaliar *in vitro* a capacidade antioxidante da formulação, através do teste de redução de radical DPPH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

-Materiais:

- Fase oleosa:

*Óleo de Buriti

INCI: Mauritia flexuosa fruit oil

Nº CAS: 394239-67-9

Fornecedor: Beraca

Especificação em **anexo 1**

*Butilhidroxitolueno

INCI: BHT

Nº CAS: 128-37-0

Fornecedor: Embacaps

-Emulsionantes

* Álcool OlefílicoEtoxilado (20EO) –

INCI Oleth-20

Nº CAS : 9004-98-2

Fornecedor: Aqia

*Álcool LaurílicoEtoxilado (2 OE).

INCI: Laureth-2

Nº CAS: 3055-93-4 / 9002-92-0 / 68439- 50-9

Fornecedor: Aqia

- Conservante antimicrobiano

* Germall Plus

INCI: Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Iodopropylnyl Butylcarbamate

Nº CAS: 78491-02-8

Fornecedor: Jovii

-Fase aquosa:

*Água destilada

*Chá Verde extrato glicólico

CAS: 84650-60-2

Fornecedor: Jovii

*Chá Verde extrato seco - Green Tea 95%

CAS: 84650-60-2

Fornecedor: Active Pharmaceutica

Especificação em **anexo 2**

*Edetato Dissódico INCI: Disodium EDTA

CAS N°: 139-33-3

Fornecedor: Embacaps

*Metabisulfito de sódio

CAS N°: 7681-57-4

Fornecedor: Mapric

4.1.1 Determinação do valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti

A determinação do valor requerido de EHL (equilíbrio hidrofílico- lipofílico) requerido para o Óleo de Buriti. 6,1 (valor do EHL do tensoativo lipofílico Laureth-2) até 15,3 (valor do EHL do tensoativo hidrofílico Oleth-20) variando a quantidade entre eles de acordo com a tabela abaixo, Tabela 1. Para o cálculo de quantidade de tensoativos utilizamos uma regra de três simples, variando a porcentagem de cada emulsionante em 10% e obtendo um EHL para cada mistura, variando aproximadamente de 1 em 1 de acordo com metodologia preconizada por Aulton (2005).

A porcentagem e quantidade de cada tensoativo utilizada em cada uma das 11 formulações, conforme EHL está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração em % e p/p de tensoativo lipofílico e hidrofílico utilizado para obtenção do EHL requerido.

Valor de EHL	Formulação	% Oleth - 20 (p/p)*	Oleth- 20% (p/p)	% Laureth-2 (p/p) *	Laureth-2% (p/p)
6,1	1E	0	0,0	100	6,0
7,02	2E	10	0,6	90	5,4
7,94	3E	20	1,2	80	4,8
8,86	4E	30	1,8	70	4,2
9,78	5E	40	2,4	60	3,6
10,7	6E	50	3,0	50	3,0
11,62	7E	60	3,6	40	2,4
12,54	8E	70	4,2	30	1,8
13,46	9E	80	4,8	20	1,2
14,38	10E	90	5,4	10	0,6
15,3	11E	100	6,0	0	0,0

* Quantidade em % (p/p) no total de sistema emulsionante (6,0%).

A partir das concentrações calculadas dos tensoativos, foram preparadas onze emulsões através do método de inversão de fases. A fase oleosa, juntamente com os tensoativos, foi aquecida a $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ (OLIVEIRA, 2008), e a fase aquosa composta de água destilada foi aquecida à mesma temperatura e vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante de aproximadamente 400rpm em agitador mecânico, até atingir a temperatura ambiente ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$). A composição das emulsões está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das emulsões para determinação do valor de EHL requerido do Óleo de Buriti

Componentes	Quantidade em % (p/p)
Óleo de Buriti	3,0
Tensoativos	6,0
Água destilada	90,5
Diazolidiniluréia+ iodopropilbutilcarbamato	0,5

A emulsão que apresentou maior estabilidade, ou seja, menos volume de cremeado e sem separação de fases, ou separação mínima, representa o valor de EHL requerido pelo óleo de constitui a fase oleosa da emulsão.

4.1.2 Obtendo as nanoemulsões

Ao total foram realizadas 30 diferentes formulações (Tabela 3), em triplicata, variando detalhes singulares em cada uma delas, para que fosse possível determinar o equilíbrio entre tensoativo e fase oleosa, substância ativa de Chá Verde, temperatura de emulsificação e velocidade de resfriamento ideais para a obtenção de uma nanoemulsão estável.

4.1.2.1 Influência da concentração da fase oleosa – variação da concentração do Óleo de Buriti

Foram realizadas quinze diferentes formulações com quantidade de emulsionante fixa, variando a concentração de Óleo de Buriti em: 5,0%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,0%. Após a realização do teste de EHL determinou-se uma nova proporção de emulsionante, variando para esta nova proporção a fase oleosa nas concentrações de: 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 10,0%, conforme demonstrado na Tabela 3.

4.1.2.2 Influência da temperatura de emulsificação

Para os mesmos emulsionantes, em proporções diferentes, foram testadas em triplicata diferentes temperaturas de emulsificação a $70\pm 5^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$, $90\pm 5^{\circ}\text{C}$. A fase oleosa foi aquecida até estas temperaturas pré-determinadas, e a fase oleosa até a mesma temperatura da fase aquosa. Ao atingir a temperatura correta, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação constante até o resfriamento. As emulsões que foram testadas quanto à temperatura de emulsificação podem ser observadas na Tabela 3.

4.1.2.3 Influência do extrato glicólico de Chá Verde e do extrato aquoso de Chá Verde

Foram testadas quatro diferentes formulações de Chá Verde, a serem adicionadas na nanoemulsão. São elas:

Chá Verde – Extrato glicólico de Chá Verde *Camellia Sinenensis* (Jovii Cosmecêutica)

Chá Verde nº 1– Extrato aquoso X% de Chá Verde extrato seco - Green Tea 95% (Active Pharmaceutical) + Germall Plus 0,5%

Chá Verde nº2 – Extrato aquoso de Y% Chá Verde extrato seco - Green Tea 95% (Active Pharmaceutical) + Germall Plus 0,5% + Trietanolamina (qsp pH 5). Mais concentrado

Chá Verde nº3 – Extrato aquoso Z% de Chá Verde extrato seco - Green Tea 95% (Active Pharmaceutical) + Germall Plus 0,5% + 0,6% metabisulfito de sódio (Mapric). Menos concentrado.

Para a preservação do sigilo patentário optou-se pela não divulgação da concentração das soluções. As soluções aquosas de Chá Verde nº 1,2 e 3 foram preparadas a frio, a partir da pesagem do extrato seco e seus respectivos ingredientes e posterior solubilização com 80% do volume total de água destilada, acertando o menisco para o volume final em balão volumétrico.

4.1.2.4 Influência da velocidade de resfriamento da emulsão

Foi testada a influência da velocidade do resfriamento das nanoemulsões após a temperatura de emulsificação. Inicialmente testou-se a formulação 17, que continha 3,0% de Óleo de Buriti. Aquecendo-se a formulação até a temperatura de emulsificação e levada a resfriamento imediato da nanoemulsão após a temperatura de emulsificação, sob agitação, colocando a mistura em um banho de gelo. Realizou-se o mesmo procedimento para as formulações 18, 19 e 20, diminuindo gradativamente o percentual de fase oleosa.

Segue na tabela abaixo um resumo de todas variáveis de das formulações teste desenvolvidas:

Tabela 3. Formulações teste realizadas

T*	Fase oleosa	EHL	Chá Verde	T de emulsificação	Variável
1	5%	13,46	-	95±5°C	Alta carga oleosa
2	4%	13,46	-	95±5°C	Diminuição da carga oleosa
3	3%	13,46	-	95±5°C	Diminuição da carga oleosa
4	3%	13,46	-	80±5°C	Diminuição da temperatura de emulsificação
5	2%	13,46	-	80±5°C	Diminuição da carga oleosa em relação a 4
6	2%	13,46	10% E.G.*	80±5°C	Adição de extrato glicólico de Chá Verde
7	2%	13,46	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da temperatura de emulsificação

8	2%	13,46	5% E.G.*	90±5°C	Diminuição da concentração do extrato de Chá Verde
9	3%	13,46	10% E.G.*	80±5°C	Igual a 4 com extrato aquoso de Chá Verde
10	3%	13,46	10% E.G.*	70±5°C	Diminuição da temperatura de emulsificação
11	5%	13,46	10% E.G.*	80±5°C	Igual a 9, com aumento da carga oleosa
12	3%	11,62	10% E.G.*	80±5°C	Ajuste do EHL experimental
13	3%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da temperatura de emulsificação
14	2%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Diminuição da fase oleosa
15	2%	11,62	10 E.G.*%	80±5°C	Diminuição da temperatura de emulsificação
16	2,5%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da fase oleosa
17	3,0%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Resfriamento imediato após temperatura de emulsificação
18	2,5%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Resfriamento imediato após temperatura de emulsificação
19	2,0%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Resfriamento imediato após temperatura de emulsificação
20	1,5%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Resfriamento imediato após temperatura de emulsificação
21	5%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da fase oleosa
22	7%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da fase oleosa
23	8%	11,62	10% E.G.*	90±5°C	Aumento da fase oleosa
24	10%	11,62	10%	90±5°C	Aumento da fase oleosa
25	3%	11,62	10% E.A.*N°1	90±5°C	Adição do extrato aquoso de Chá Verde n°1
26	3%	11,62	5%	90±5°C	Menor adição do extrato aquoso de

			E.A.*N°1		Chá Verde nº1
27	3%	11,62	10% E.A.*N°2	90±5°C	Adição do extrato aquoso de Chá Verde nº2
28	3%	11,62	3% E.A.*N°2	90±5°C	Adição do extrato aquoso de Chá Verde nº3
29	3%	11,62	5% E.A.*N°3	90±5°C	Adição do extrato aquoso de Chá Verde nº3
30	3%	11,62	10% E.A.*N°4	90±5°C	Aumento da adição do extrato aquoso de Chá Verde nº3

T* Amostra

E.G*. Extrato glicólico

E.A* Extrato aquoso

4.1.3 Método de preparo das formulações

As formulações foram preparadas pelo método baixa energia por inversão de fases, através das propriedades físico-químicas do sistema, ocorre a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido. A fase oleosa foi aquecida em banho-maria sob agitação mecânica até a temperatura preconizada no planejamento da formulação teste. A fase aquosa composta de água destilada foi aquecida à mesma temperatura. Após o aquecimento, a fase aquosa foi adicionada, com velocidade moderada sob agitação constante de 400 rpm (Agitador Mecânico Fisatom®). A agitação foi mantida até temperatura ambiente 25±5 °C, quando foram adicionados à formulação o conservante e o agente quelante, e por fim a solução de Chá Verde quando o mesmo fazia parte do planejamento da formulação. Deixou-se homogeneizar os componentes por mais 5 minutos, sob agitação, conforme pode ser observado na Figura 6 abaixo. Por motivos de sigilo patentário optou-se pela não exposição da formulação completa da nanoemulsão.



Figura 6. Homogeneização final da nanoemulsão, após adição do extrato de Chá Verde.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

4.2.1 Determinação do valor de pH

O pH das formulações desenvolvidas foi determinado em temperatura ambiente, $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, empregando eletrodo do potenciômetro da marca Digimed (modelo CV2, São Paulo, Brasil) diretamente na amostra, não sendo necessária diluição prévia devido à fluidez das emulsões (ANVISA, 2004).

4.2.2 Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta

O potencial zeta e o tamanho das partículas foi obtido através da derivação da mobilidade eletroforética determinada, utilizando o *Zeta Potential Analyzer*, modelo ZEN3600 da Malvern Instruments (Reino Unido). Este sistema analisa a mobilidade das partículas colóides ($0,02$ a $3,0\ \mu\text{m}$) em dispersões líquidas, utilizando medições independentes e simultâneas com laser Doppler com ângulo de incidência de 90° . A distribuição de tamanho

das partículas é baseada em espectroscopia de correlação de fótons. Esta caracteriza o tamanho das partículas (granulometria) iluminando-as com laser.

As amostras foram diluídas 100 vezes em água destilada, a temperatura ambiente, no momento da análise. Foram homogeneizadas e introduzidas na cubeta descartável também da marca Malvern, modelo: DTS1070. Então se procedeu a leitura.

4.2.3 Avaliação morfológica

A morfologia da nanoemulsão foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (Transmission Electron Microscopy - TEM) JEOL operando em 120 kV, com um aumento de 130.000 vezes. As suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em água Milli-Q[®] e depositadas diretamente nos *grids* utilizados para a observação das amostras. Após a secagem completa do material depositado, aplica-se como agente de contraste uma solução de acetato de uranila (2% m/v). As suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em água Milli-Q[®] e depositadas diretamente nos *grids* utilizados para a observação das amostras utilizando como contraste solução de acetato de uranila (2% m/v).

A microscopia eletrônica de transmissão é a mais acurada, dentre as técnicas atuais, para a observação direta de estrutura de materiais atômicos. O microscópio consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada. Um feixe de elétrons é produzido e acelerado no canhão eletrônico, sofrendo uma primeira focalização na sua saída, denominada *crossover* do canhão. A seguir, o feixe passa por duas lentes magnéticas, C1 e C2, que são ajustadas para iluminar a amostra com um feixe de elétrons, geralmente paralelos e com uma secção de alguns micrometros. Ainda nesse trecho existe uma abertura (diafragma) que controla a coerência, intensidade e paralelismo do feixe. A este conjunto que conduz os elétrons do canhão até a amostra dá-se o nome de sistema de iluminação.

Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, um conjunto de lentes magnéticas objetivas captura o feixe espalhado que atravessou a amostra, em especial na direção direta, e trabalha-o para conseguir a formação de uma imagem nítida e ampliada dessa distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes são posicionadas para controle de intensidade e contraste para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela fosforescente ou na chapa fotográfica.

4.2.4 Teste de Estabilidade

A estabilidade foi avaliada de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004). Os testes realizados estão descritos a seguir.

4.2.4.1 Teste preliminar

Antes de iniciar os estudos de estabilidade a amostra foi submetida à centrifugação de 3.000 rpm durante 30 minutos. O produto deve permanecer estável, sem qualquer sinal de instabilidade, como separação de fases.

4.2.4.2 Estabilidade Acelerada

O teste de estabilidade acelerada, ou preliminar ou de Curto Prazo, tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. Para a realização deste teste, todas as amostras desenvolvidas tiveram seus parâmetros de pH e densidade avaliados no tempo zero (dia 1) e foram avaliados sucessivamente diariamente até o final de 28 dias. Neste período, as amostras foram acondicionadas em vidro neutro transparente, com tampa com boa vedação, contendo quantidade de produto suficiente para a realização das análises, segundo o Guia de Estabilidade. As amostras foram acondicionadas por ciclos de 24 horas em duas diferentes condições de temperatura:

Ciclo frio – geladeira $T= 5\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Ciclo quente – estufa $T= 40\pm 2^{\circ}\text{C}$

A cada troca de ciclo as amostras ficaram expostas à temperatura ambiente para que suas características físico-químicas fossem analisadas a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$.

4.2.4.3 Teste de prateleira

Uma amostra de cada lote foi guardada em temperatura ambiente para a realização do teste de prateleira. Também conhecido como Estabilidade de longa duração ou *Shelf life*, o

teste tem como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimado no teste de estabilidade acelerada. É usado para avaliar o comportamento do produto em condições normais de armazenamento. Seu pH e características organolépticas são avaliados no dia inicial do teste e mensalmente até o final do prazo de validade. Segundo *International Conference Harmonization*, um período 3 a 6 meses de estabilidade acelerada podem corresponder a um prazo de validade de 24 meses, para qualquer produto farmacêutico, não especificamente para um cosmético.

4.2.4.4 Avaliação Microbiológica

Os testes microbiológicos foram realizados seguindo a Farmacopéia Brasileira (2010) , com o objetivo de assegurar a eficácia de conservantes antimicrobianos adicionados à nanoemulsão para os seguintes microrganismos:

Bactérias:

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

Meio de cultura: Soybean-Casein Digest Agar

Temperatura de incubação: 32,5 +- 2,5 °C

Tempo de incubação do inóculo: 18 - 24 h

Fungos:

- *Candida albicans*
- *Aspergillus Níger*

Meio de cultura: Sabouraud dextrose Broth

Temperatura de incubação: 22,5 +- 2,5 °C

Tempo de incubação do inóculo: 44-52 h para *Candida*,

6 a 10 dias para *Aspergillus*

A inoculação dos microrganismos foi realizada em ambiente estéril com diluição seriada de 10^3 utilizando solução salina (0,9 % NaCl) nos respectivos meios de cultura para

crescimento dos microrganismos, e incubados em estufa conforme as temperaturas e tempos de crescimentos descritos anteriormente.

4.2.5 Avaliação das propriedades da formulação

4.2.5.1 Caracterização do extrato aquoso de Chá Verde - Determinação de polifenóis totais do de *Camellia Sinensis* pelo método colorimétrico

Para a caracterização do extrato aquoso de Chá Verde realizou-se a determinação de polifenóis totais de Chá Verde, utilizando o método colorimétrico com o reagente Folin – Ciocalteu, de acordo com metodologia preconizada na International Standar Organization, ISO 14502-1 (2005).

- Materiais:
 - Água destilada
 - Reagente Solução de Folin Ciocalteu 10%
 - Solução de Carbonato de Sódio 7,5%
 - Ácido gálico

Realizou-se, em triplicata, cinco diluições diferentes do ácido gálico para a realização da curva de calibração (0µg/mL, 10µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL). Em cada tubo adicionamos 1,5mL de reagente Folin Ciocalteu, 1,2mL de solução de carbonato de sódio 7,5% e 0,3mL de cada diluição de padrão. O mesmo procedeu-se, em triplicata, para a amostra, nas diluições de 40µg/mL e 50µg/mL. Os tubos foram homogeneizados e guardados ao abrigo da luz, em temperatura ambiente $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Foram então medidas as absorvâncias no Espectro Varian, modelo Cary 50 Bio, em cubetas de quartzo no comprimento de onda de 765nm. O branco utilizado foi água destilada. O resultado é expresso em µg/mL de ácido gálico.

4.2.5.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* desta formulação

A atividade antioxidante foi determinada através do teste de redução de radical DPPH, descrito por Brand-William em 1995. A determinação é feita utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH *). Na sua forma mais radical o DPPH * tem uma banda de absorção em 515 nm, que desaparece após a redução de um composto antirradical. Assim, isso comprova a capacidade antioxidante ao sequestrar radicais livres (BRAND-WILLIAMS et. al., 1995). A diminuição da absorbância de DPPH causada por substâncias ativas antioxidantes é dada por reações entre as moléculas antioxidantes e o radical, resultando no sequestro de radical livre por doação de hidrogênio (MURUHAB, SELVARAJ, VISWANATHAN, 2013).

Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH* residual (violeta), mensurado após o tempo de reação, corresponde inversamente à capacidade antioxidante da substância analisada.

- Materiais Necessários:

- Reagentes:

- Ácool metílico P.A.

- Água destilada

- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3) – Sigma

- Equipamentos e vidrarias:

- Agitador de tubos de ensaio

- Balança analítica

- Balão volumétrico 100 mL e 1.000 mL

- Cronômetro digital

- Cubetas de quartzo (4 x 1 cm)

- Espectrofotômetro

- Pipeta automática (10 1000 µL)

- Proveta de 50 mL

- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8mL)

- Método

A metodologia científica empregada nesta análise foi adaptada do Comunicado Técnico nº 127 da Embrapa (2007) para a Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH. Primeiramente foram preparadas em balão volumétrico as soluções controle (álcool metílico 50%) e solução metanólica de DPPH 0,06Mm.

- Determinação da curva do DPPH

Primeiramente realizou-se a Curva do DPPH, através da análise de sete diferentes concentrações (0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60µM) de DPPH, e realizou-se a leitura em microcubeta de quartzo no espectrofotômetro Thermo Bio Mate em um comprimento de onda de 515 nm, em ambiente escuro para evitar a fotoxidação do DPPH.

Para análise da amostra, prepararam-se soluções metanólicas em três diferentes concentrações, cada uma em triplicata para a nanoemulsão, para o extrato aquoso de Chá Verde e para o branco da formulação (nanoemulsão contendo todos os compostos, inclusive os antioxidantes da formulação e do extrato de Chá Verde nº 3, menos as substâncias ativas: Óleo de Buriti e extrato aquoso de Chá Verde), e controle (álcool metílico e água). Em ambiente escuro pipetou-se 0,1mL de cada diluição (de nanoemulsão, extrato aquoso de Chá Verde, branco, e controle) e acrescentou 3,9mL do radical DPPH 0,06mM. Os tubos foram homogeneizados e deixados por 60 minutos em ambiente escuro antes de realizar a leitura.

O álcool metílico foi usado como branco para a calibração do espectrofotômetro. As leituras foram realizadas a cada minuto, até sua estabilização.

A atividade antioxidante foi expressa em % de inibição do DPPH, através da equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{[(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra})]}{\text{Absorbância do controle}} * 100$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa Graph Pad Prsim e Assistant 7.7. Os dados foram expressos pela média do desvio padrão. A comparação entre diferentes grupos, e a variância ANOVA e testes Tukey. Para grupos menores de três foi aplicado o teste t Student. Em ambos foram consideradas diferenças significativas $p > 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO

5.1.1 Determinação do valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti

A estabilidade das emulsões deve-se principalmente ao uso de tensoativos na sua preparação, compostos anfifílicos em cuja molécula existem grupamentos hidrófilos e lipófilos que se posicionam entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando a película interfacial que diminui a tensão entre elas e estabiliza o sistema. O balanço entre as duas porções moleculares com características opostas dessas substâncias é denominado EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo. Este representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares (GRIFFIN, 1949; LACHMAN, 1986).

Segundo o fornecedor (Beraca), o EHL teórico requerido para o Óleo de Buriti seria 13,46, o que nos levou a trabalhar com uma proporção de emulsionantes para tal equilíbrio hidrófilo lipofilo. Porém, de acordo com Zanatta (2008) os valores de EHL podem variar inclusive entre lotes de mesmo óleo, por se tratarem de uma matéria-prima de origem vegetal. Dada a dificuldade de estabilidade das formulações seguindo EHL experimental, nós determinamos experimentalmente o EHL do Óleo de Buriti usado para o desenvolvimento da nanoemulsão. E o resultado se difere do citado anteriormente. A Figura 6 apresenta o resultado da estabilidade das emulsões preparadas para a verificação do EHL requerido pelo Óleo de Buriti.

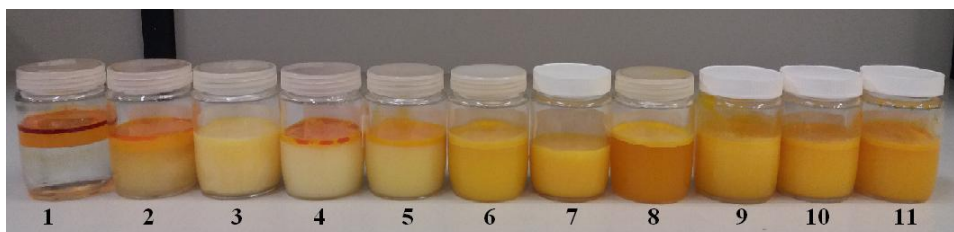


Figura 7. Estabilidade das emulsões testadas para determinação do EHL do Óleo de Buriti

Na Tabela 4, pode-se observar que a emulsão 7E (EHL 11,62) manteve-se estável, pois não ocorreu separação de fases.

Tabela 4. Valor de EHL requerido para o Óleo de Buriti na nanoemulsão.

Valor de EHL	Formulação	% Oleth 20 (p/p)*	Oleth 20 % (p/p)	% Laureth 2 (p/p) *	Laureth 2% (p/p)
11,62	7E	60	3,6	40	2,4

Este resultado é corroborado pelos dados da Tabela 5, onde foi calculado o percentual de cremação de todas as emulsões testadas, conforme demonstra a Figura 8. A emulsão 7 apresentou o índice de cremação igual a zero, o que indica sua estabilidade. Segundo Florance (2003), no valor ótimo de EHL o tamanho dos glóbulos é mínimo, e isso explicaria a sua estabilidade.

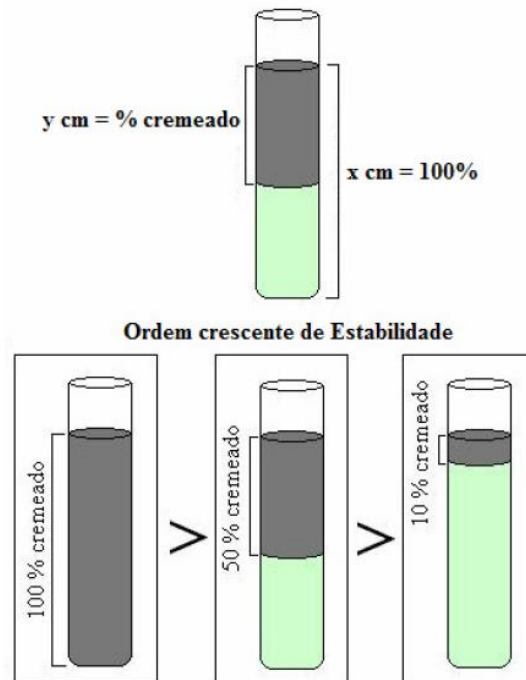


Figura 8. Demonstrativo de cálculo de porcentagem de cremação (MARUNO, 2009).

Tabela 5. Percentual de cremação das emulsões testadas para determinação do EHL do Óleo de Buriti.

Amostra	% de cremação
T1	27,66
T2	29,27
T3	12,5
T4	10
T5	10
T6	9

T7	0
T8	7,14
T9	9,76
T10	11,39
T11	12,5

A partir dos dados acima foi determinado que o EHL requerido pela fase foi 11,62, portanto o EHL resultante da mistura de emulsionantes empregada para emulsificar o Óleo de Buriti teve como valor 11,62.

5.1.2 Obtendo as nanoemulsões

5.1.2.1 Influência da concentração da fase oleosa– variação da concentração do Óleo de Buriti

A concentração da fase oleosa foi determinada de forma aleatória, buscando a incorporação da máxima quantidade de óleo no sistema, sem ultrapassar a quantidade máxima de emulsionante de 6%. Acima desta concentração, a formulação adquire viscosidade, uma vez que a substância ativa Oleth-20 é sólida em temperatura ambiente. Além disso, foi investigado por Zanatta (2008) em células cultura celular de queratinócitos HaCat que concentrações de 10% de Óleo de Buriti contendo 10% de emulsionante apresentam citotoxicidade.

Testamos então concentrações de Óleo de Buriti de 10,0%, 8,0%, 7,0%, 6,0%, 5,0%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%. Para a proporção total de emulsionante de 6,0% e EHL experimental de 11,62, a concentração de Óleo de Buriti ideal para estabilidade e características granulométricas é de 3,0%.

Observou-se, que a diminuição do conteúdo oleoso, para esta proporção de emulsionante acarretou a diminuição do tamanho das partículas. A formulação 14, por exemplo, contendo 2,0% de Óleo de Buriti apresentou um tamanho de partícula entre 25,87nm – 26,58nm.

5.1.2.2 Influência da temperatura de emulsificação

A emulsificação a frio foi descartada para o sistema, pois o emulsificante Oleth-20 é sólido a temperatura ambiente, e em testes preliminares apenas o Laureth-2 (líquido) não é capaz de emulsionar o sistema. Foram então determinadas três diferentes temperaturas: $90\pm 5^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5^{\circ}\text{C}$. Em todos os testes foram usados os mesmos emulsionantes, em alguns casos em proporções diferentes, alterando uma variável por vez. Todos os testes foram feitos em triplicata. As emulsões preparadas a $70\pm 5^{\circ}\text{C}$ apresentaram separação de fases em menos de 24 horas após a preparação. As melhores temperaturas de emulsificação foram $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ e $80\pm 5^{\circ}\text{C}$. Contudo, as desenvolvidas a $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ apresentaram menor polidispersão e estabilidade em relação às preparadas a $80\pm 5^{\circ}\text{C}$, que apresentaram separação de fases em menos de duas semanas. Todas as formulações apresentaram aspecto leitoso, coloração amarelada e com odor característico do Óleo de Buriti.

Segundo Liu (2006), com o aumento da temperatura de emulsificação ocorre uma diminuição da viscosidade da fase oleosa, diminuindo a coesão entre as moléculas, o que conseqüentemente facilita a solubilização do óleo no tensoativo, favorecendo a formação de glóbulos de pequeno diâmetro.

Os resultados obtidos sugerem que a temperatura de emulsificação é um fator relevante para a estabilidade e para as características granulométricas deste tipo de sistema emulsionante.

5.1.2.3 Influência do extrato glicólico de Chá Verde e do extrato aquoso de Chá Verde

Foram testadas quatro diferentes formulações de Chá Verde. Inicialmente realizamos as formulações com extrato glicólico de Chá Verde *Camellia Sinensis* (Jovii), adquirido pronto, variando sua concentração entre 5% e 10%. Aparentemente, não se notou diferença na estabilidade das formulações, apenas nas características organolépticas, pois como o extrato glicólico de Chá Verde possui uma coloração castanha intensa característica, o aumento da sua adição deixou as formulações mais escuras. Buscamos outra fonte desta matéria-prima pois em contato com o fornecedor, não é possível obter um laudo com a concentração exata de *Camellia Sinensis* no produto.

Para prosseguir com os experimentos foi adquirido o Chá Verde extrato seco – Green Tea 95%, que, segundo especificação do fornecedor (Anexo 1), possui cerca de 95% de polifenóis. Foi então preparada uma solução aquosa do extrato para garantir dispersão

homogênea na formulação. Ao adicionarmos o extrato Chá Verde nº 1 – Extrato aquoso na formulação 25, a formulação turvou imediatamente e iniciou o processo de separação de fases. Na formulação 26 então, preparamos a nanoemulsão da mesma forma, adicionando 5% do extrato Chá Verde nº 1, e a formulação apresentou a mesma incompatibilidade. Medimos então o pH da extrato Chá Verde nº 1, e mesma apresentou pH 1,0. Preparamos então o extrato de Chá Verde nº 2 – Extrato aquoso, em que ajustamos o pH da solução aquosa para 5,0. Contudo, no momento da adição da trietanolamina para ajuste do pH na solução, houve uma incompatibilidade imediata do extrato com o corretor de pH. Foi feita a diminuição da concentração da substancia ativa, chegando ao extrato aquoso Chá Verde nº 3. Além disso, iniciamos adicionando uma quantidade menor do extrato na formulação da nanoemulsão para 3,0% (fórmula 28). Observamos que não houve incompatibilidade e elevando então para 5,0% (formulação 29), que também foi compatível. Elevamos então para a quantidade de 10% (formulação 30), e a formulação não apresentou nenhuma incompatibilidade. Estabelecemos assim que Chá Verde nº 3 na concentração de 10% apresenta características ideais para nossa formulação.

5.1.2.4 Influência da velocidade de resfriamento da emulsão

No desenvolvimento de nanopartículas sólidas por homogeneização a alta pressão, a velocidade de resfriamento favorece a distribuição homogênea do princípio ativo no interior da matriz lipídica (DINGLER, 2002). As formulações 17, 18, 19 e 20 foram desenvolvidas realizando o resfriamento imediato da formulação após atingirem a temperatura de inversão de fases. Na formulação 17, contendo 3,0% de Óleo de Buriti, após o resfriamento da nanoemulsão e interrupção da agitação a formulação apresentou separação de fases. Repetimos, então, diminuindo progressivamente a carga oleosa, até 1,5% (formulação 18, 19, 20), mas todas as formulações apresentaram mesma instabilidade. Constatamos assim que para nosso sistema emulsionante o resfriamento imediato em banho de gelo não é aconselhado, pois perturba as partículas, estressando a capacidade emulsionante do tensoativo. Determinamos que, para nosso sistema emulsionante, a metodologia ideal é o resfriamento gradual da formulação sob agitação a temperatura ambiente, com tempo médio de resfriamento de $(80\pm 5^{\circ}\text{C}$ a $30\pm 5^{\circ}\text{C})$ em aproximadamente 20 minutos, sob agitação constante.

5.1.2. 5 Método de preparo das formulações

A metodologia ideal determinada para da nanoemulsão foi baixa energia, por temperatura de inversão de fases, consistindo no aquecimento da fase aquosa e fase oleosa até $90\pm 5^\circ$, sob agitação mecânica a 400 rpm (Agitador Mecânico Fisatom®), mantendo-se a agitação até que o sistema atinja a temperatura ambiente $25\pm 5^\circ\text{C}$, com a então adição à formulação do conservante, o agente quelante, e da solução de Chá Verde nº3.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

5.2.1 Determinação do valor de pH

Todas as formulações (1-30) apresentaram pH próximos ao da pele (4,0 e 7,0) a fim de evitar alterações fisiológicas que possam comprometer a sua integridade (TAYLOR *et. al.*, 1990). O pH médio da nanoemulsão ficou abaixo deste valor, em torno de 3,6, porém, sendo um potencial princípio ativo e não um produto acabado, este valor pode ser ajustado na formulação final. A tabela abaixo (Tabela 6) apresenta os valores de pH obtidos das triplicatas da nanoemulsão no dia 1 (pH inicial), dia 7 e dia 28 após a preparação das amostras em estabilidade acelerada.

Tabela 6. Valores iniciais, finais e médios de pH por lote de nanoemulsão.

Amostra	pH inicial	pH dia 7	pH dia 28	Média	Desvio padrão
A	3,5	3,58	3,67	3,58	$\pm 0,08$
B	3,46	3,63	3,72	3,6	$\pm 0,13$
C	3,47	3,58	3,77	3,61	$\pm 0,15$
pH médio	3,48	3,60	3,72		

Os resultados acima foram plotados em um gráfico demonstrado na Figura 9. Os resultados foram analisados em ANOVA com um $p > 0,05$, ($p = 0,0494$), o que demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa na variação do pH no final do teste de estabilidade.

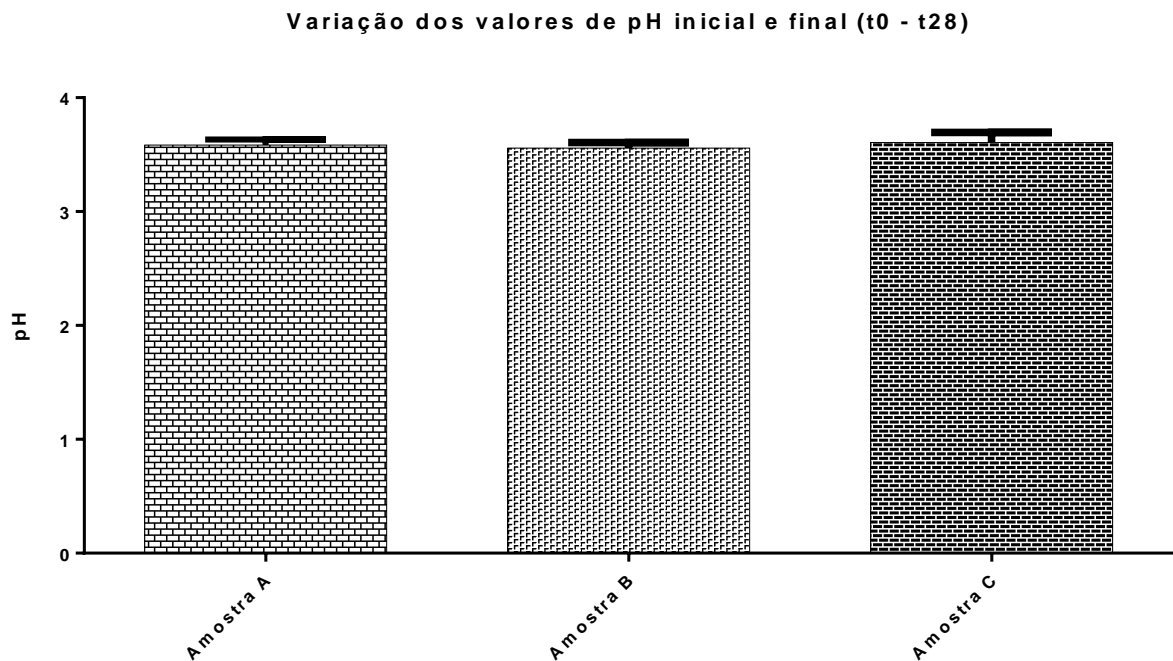


Figura 9. Gráfico demonstrativo da variação não significativa dos valores de pH inicial e final $p=0,0494$.

O valor de pH é uma característica indicativa para o monitoramento de estabilidade em emulsões. Em geral, reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem prejudicar a qualidade de um cosmético, ou substância ativa cosmética, causam alterações perceptíveis no seu valor. Emulsões formuladas com óleos vegetais, como esta nanoemulsão, podem apresentar diminuição do valor do pH, decorrente da hidrólise dos ácidos graxos, gerando ácidos graxos livres que diminuem o pH e, conseqüentemente, a instabilidade (MARUNO, 2009).

5.2.2 Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta

Abaixo estão demonstradas nos resultados demonstrados nos gráficos de tamanho de partícula, com valores de polidispersão das nanoemulsões (Pdi) em triplicata no tempo inicial, e após 28 dias em estabilidade acelerada.

Amostra 32 A - Tamanho da partícula médio com 137 nm. Potencial Zeta: -32,0 Pdi:0,052.

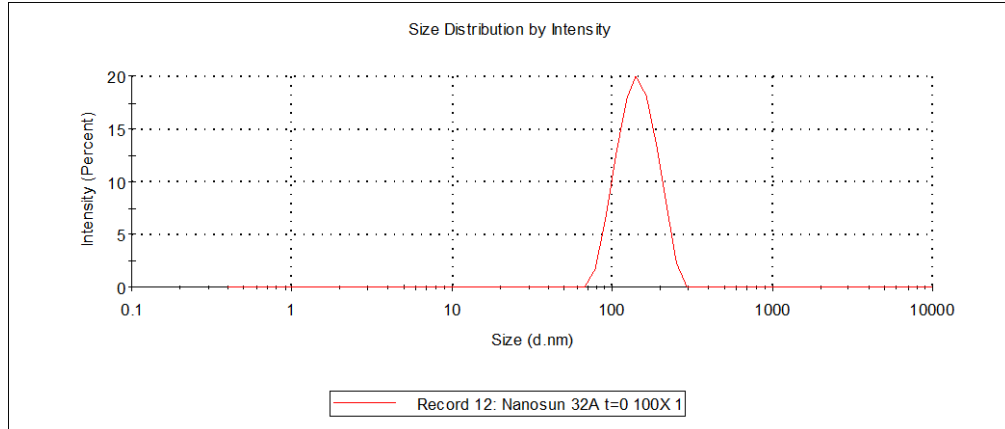


Figura 10. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial Amostra 32A.

Amostra 32 B - Tamanho da partícula médio com 142 nm. Potencial Zeta: -27,4 Pdi:0,040.

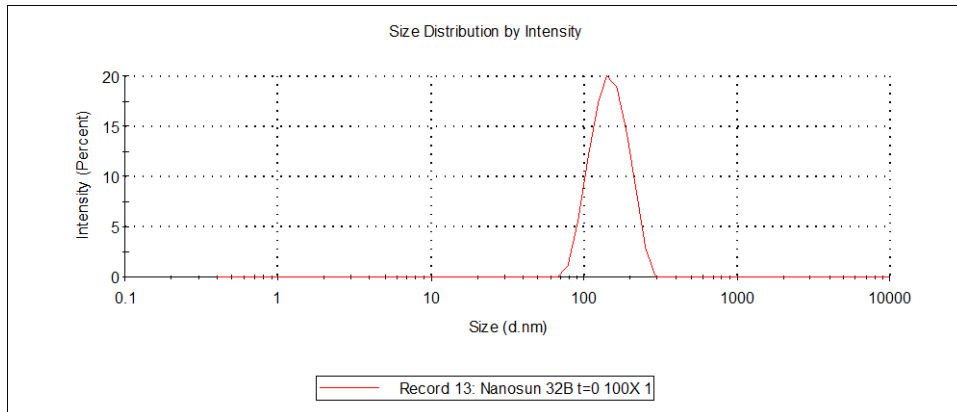


Figura 11. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial Amostra 32 B.

Amostra 32 C - Tamanho da partícula médio com 129 nm. Potencial Zeta: -19,0. Pdi: 0,091

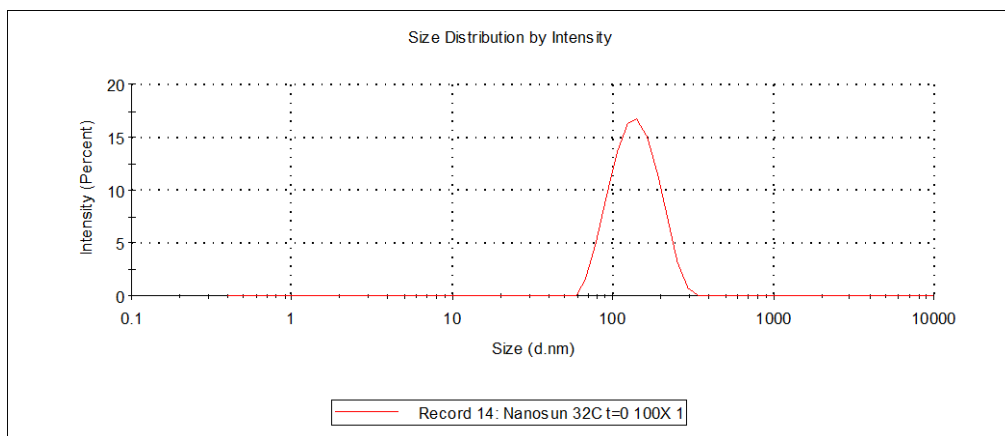


Figura 12. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade inicial Amostra 32C.

Amostra 32 A - Tamanho da partícula médio com 136 nm. Potencial Zeta: - 31,5. Pdi:0,056

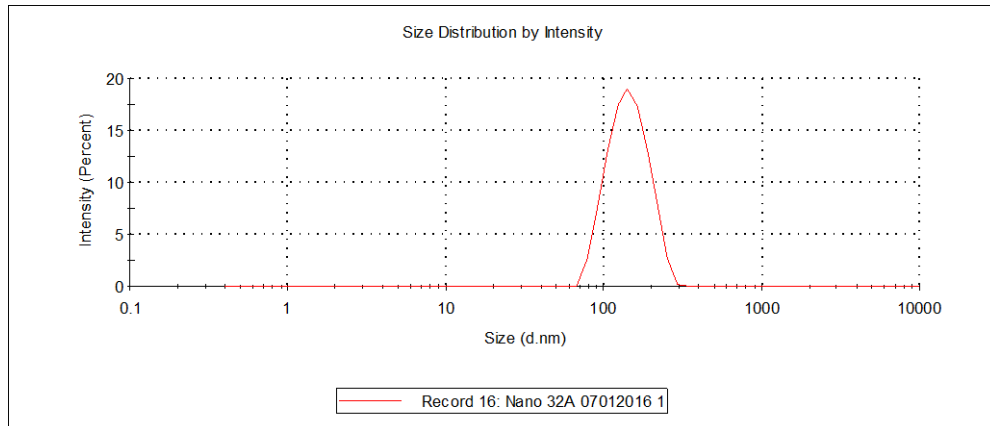


Figura 13. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.

Amostra 32 B - Tamanho da partícula médio com 142 nm. Potencial Zeta: -26,9 Pdi:0,053.

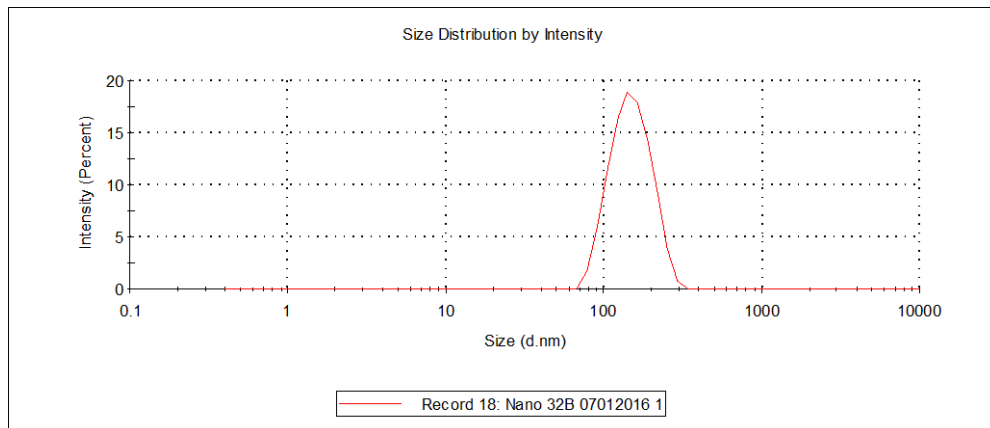


Figura 14. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.

Amostra 32 C - Tamanho da partícula médio com 142 nm. Potencial Zeta: - 19,2. Pdi:0,053

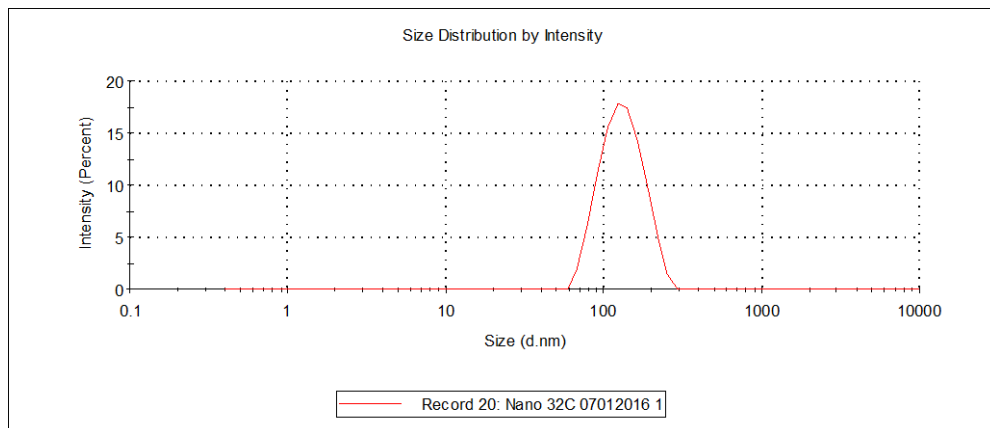


Figura 15. Gráfico do tamanho de partícula por intensidade após 28 dias de estabilidade acelerada.

Abaixo se encontram compilados os valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão das triplicatas.

Tabela 7. Análise comparativa dos tamanhos das partículas e polidispersão das triplicatas das nanoemulsões.

Amostra	Tamanho inicial (nm)	Tamanho final (nm)	Média* (nm)	Desvio padrão	Pdi inicial	Pdi final	Média *	Desvio padrão
32A	137	136	137,3	±0,71	0,052	0,056	0,05	±0,21
32B	142	142	142,4	±0,42	0,04	0,053	0,05	±0,01
32C	129	123	126,5	±3,89	0,091	0,071	0,08	±0,01
Tamanho*final			135,4*	±8,12*	Pdi * final		0,06*	±0,01*

O índice de polidispersão (IP) revela a qualidade da dispersão. As nanoemulsões apresentaram IP abaixo de 0,1, que é considerada uma medida adequada. Valores acima de 1,0 são indicativos de amostras de baixa qualidade, o que significa a presença de glóbulos de tamanho coloidal de alta polidispersividade (BHADARI, 2007). Logo, os baixos valores de polidispersão são indicativos de uma amostra de qualidade com tamanho de partícula relativamente homogêneo. Segundo Yilmaz (2005), o índice de polidispersão deve ser menor que 0,25 devido à redução do fenômeno *Ostwald ripening*.

Conforme observado na figura 15 (abaixo), podemos observar que a variação do tamanho de partícula das triplicatas inicial e depois dos 28 dias de estabilidade não foi significativa ao analisado por ANOVA ($p > 0,05$), sendo $p = 0,0006$, o que demonstra que foram estáveis.

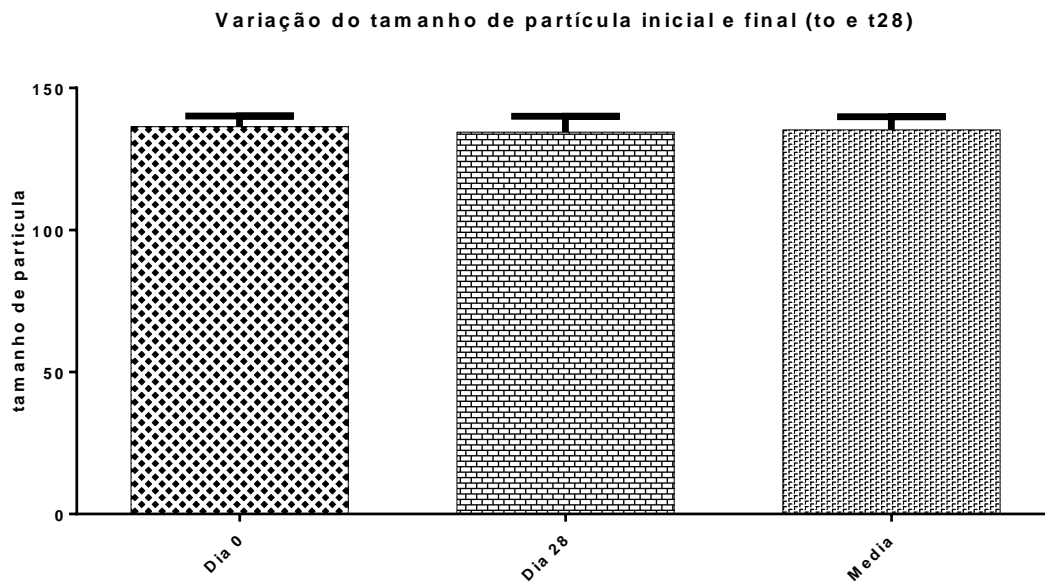


Figura 16. Varição do tamanho da partícula das triplicatas no dia inicial e depois de 28 dias de estabilidade acelerada.

Ao analisarmos, porém, os dados entre as triplicatas, observamos que os valores de tamanho de partículas em nanômetros das triplicatas analisado por ANOVA são sim estatisticamente significativos ($p > 0,05$) $p = 0,4023$. Assim, este resultado nos indica que é necessária uma melhor padronização do processo de obtenção da nanoemulsão, com temperatura ambiente controlada, agitação, e aquecimento, para que este valor seja melhorado futuramente. Podemos observar a diferença de tamanho de partícula entre as triplicatas na Figura 16 abaixo.

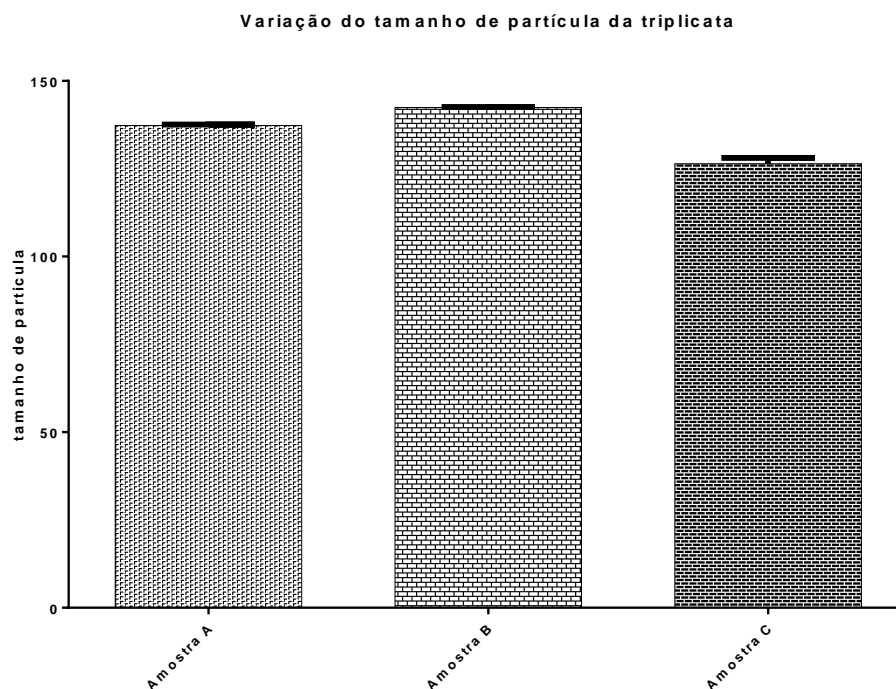


Figura 17. Varição do tamanho da partícula entre os lotes de triplicata da nanoemulsão.

A determinação do *potencial zeta* é um instrumento útil para caracterizar as cargas superficiais dos sistemas coloidais (ROLAND, 2003). Também segundo Roland (2003) um elevado valor de potencial zeta, de 30mV em módulo, é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que as forças repulsivas tendem a evitar uma possível floculação. Mesmos com os valores das amostras B e C sendo inferiores a este valor, podem sugerir que a formulação tem uma boa estabilidade, devido a baixa variação do potencial zeta no tempo inicial e após 28 dias em estabilidade acelerada, como podemos observar na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Variação do potencial zeta inicial e após 28 em estabilidade acelerada da nanoemulsão.

Amostra	Potencial zeta inicial (mV)	Potencial zeta final (mV)	Desvio padrão
Amostra A	-32,0	-31,5	±0,35
Amostra B	-27,4	-26,9	±0,35
Amostra C	-19,0	-19,2	±0,14

Pesquisando em literatura e fontes específicas observou-se que o valor de zeta é variável de acordo com as formulações, especialmente para nanoemulsões. Os valores negativos de potencial zeta indicam cargas negativas ao redor das nanogotículas da emulsão, podem ser originadas da estabilização estérica do tensoativo não iônico com a fase dispersiva, a água.

5.2.3 Avaliação morfológica

A morfologia da nanoemulsão foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (Transmission Electron Microscopy - TEM) JEOL operando em 120 kV, com um aumento de 130.000 vezes. Proporcionou esta imagem da nanoemulsão desenvolvida, conforme a Figura 18.

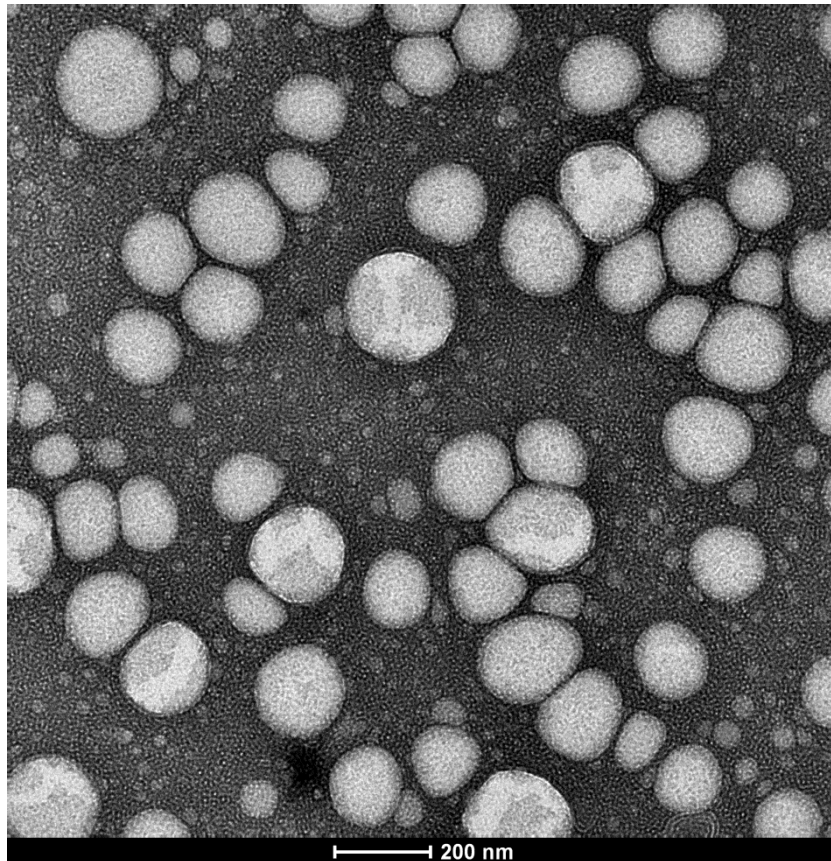


Figura 18. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV), evidenciando a morfologia das nanoemulsões. Escala 200nm, aumento de 130.000x.

A imagem confirma o tamanho nanométrico das partículas além de sua morfologia circular de nanogotículas.

5.2.4 Teste de estabilidade

Segundo a Monografia da International Federation of Societies of Cosmetic Chemist – IFSCC, o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como é um procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

Formulação, transporte, armazenamento, modo de uso, e outros fatores, podem ser classificados com intrínsecos ou extrínsecos.

Os fatores intrínsecos são: incompatibilidade física, incompatibilidade química, reações de oxi-redução, reações de hidrólise, interação entre ingredientes da formulação, e interação entre ingredientes da formulação e material de acondicionamento. Já os fatores

extrínsecos são: tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microorganismos e vibração.

- Parâmetros de avaliação de estabilidade. De modo geral se avaliam:
 - parâmetros organolépticos: aspecto, cor, odor e sabor quando aplicável.
 - parâmetros físico-químicos: valor de pH, viscosidade, densidade.
 - parâmetros microbiológicos: contagem microbiana e teste de desafio do conservante (*Challenge Test*).

De maneira geral, as triplicatas foram aprovadas no teste de estabilidade, sem apresentar variações significativas, organolépticas, físico-químicas e/ou morfológicas.

5.2.4.1 Teste preliminar

As triplicatas foram aprovadas no teste de estabilidade preliminar, mantendo-se homogêneas após centrifugação.

5.2.4.2 Estabilidade Acelerada

Avaliação das características organolépticas

Aspecto

Amostra	DIA 1	DIA 7	DIA 28
32 A	N	N	N
32 B	N	N	N
32 C	N	N	N

Cor

Amostra	DIA 1	DIA 7	DIA 28
32 A	N	N	N
32 B	N	N	N
32 C	N	N	N

Odor

Amostra	DIA 1	DIA 7	DIA 28
32 A	N	N	N
32 B	N	N	N
32 C	N	N	N

LEGENDA:

N= Normal sem alteração

LM: Levemente modificado

M: Modificado

IM: Intensamente modificado

Este resultado demonstra a estabilidade das características organolépticas das triplicatas das nanoemulsões, expostas à estabilidade acelerada.

5.2.4.3 Teste de prateleira

O teste de estabilidade de prateleira está em andamento pelo período total do prazo de validade do produto.

5.2.4.4. Avaliação Microbiológica

Após o tempo necessário de incubação o material, em estufa conforme as temperaturas e tempos de crescimentos descritos, as amostras não apresentaram crescimento dos microrganismos testados. Sendo assim a análise microbiológica assegura a eficácia do sistema conservante empregado na nanoemulsão. Estando de acordo com os parâmetros estabelecidos na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição.

5.2.5 Avaliação das propriedades da formulação**5.2.5.1 Caracterização do extrato aquoso de Chá Verde - Determinação de polifenóis totais do de *Camellia Sinensis* pelo método colorimétrico**

Para averiguar a qualidade do extrato de Chá Verde usado como princípio ativo da nanoemulsão realizou-se o doseamento de polifenóis. A partir das absorbâncias obtidas para as diferentes concentrações de padrão de ácido gálico, construímos uma tabela e plotamos os valores para construção de um gráfico da curva de ácido gálico. Este gráfico nos permitiu calcular a equação da reta que nos expressa a quantidade de polifenóis totais em $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico, convertendo-se este valor para porcentagem de extrato seco de Chá Verde, o valor encontrado para a amostra foi de 27%, bem inferior ao declarado pelo fornecedor. Porém nossa curva de calibração de ácido gálico apresentou uma linearidade não conforme, o que nos sugere a necessidade de repetição do ensaio, para obtenção de resultados mais conclusivos. Por se tratar de um método colorimétrico sensível, erros de pipetagem podem ter prejudicado a linearidade da reta de calibração.

5.2.5.2 Avaliação da atividade antioxidante in vitro desta formulação

Os valores de % de inibição do radical DPPH foram analisados no Software Assistant versão 7.7 Beta, apresentando um $p < 0,01$, coeficiente de variação de 17%, diferença mínima significativa de 23,89, conforme se pode observar no gráfico abaixo. O erro das triplicas foi avaliado pelo programa GraphPad.

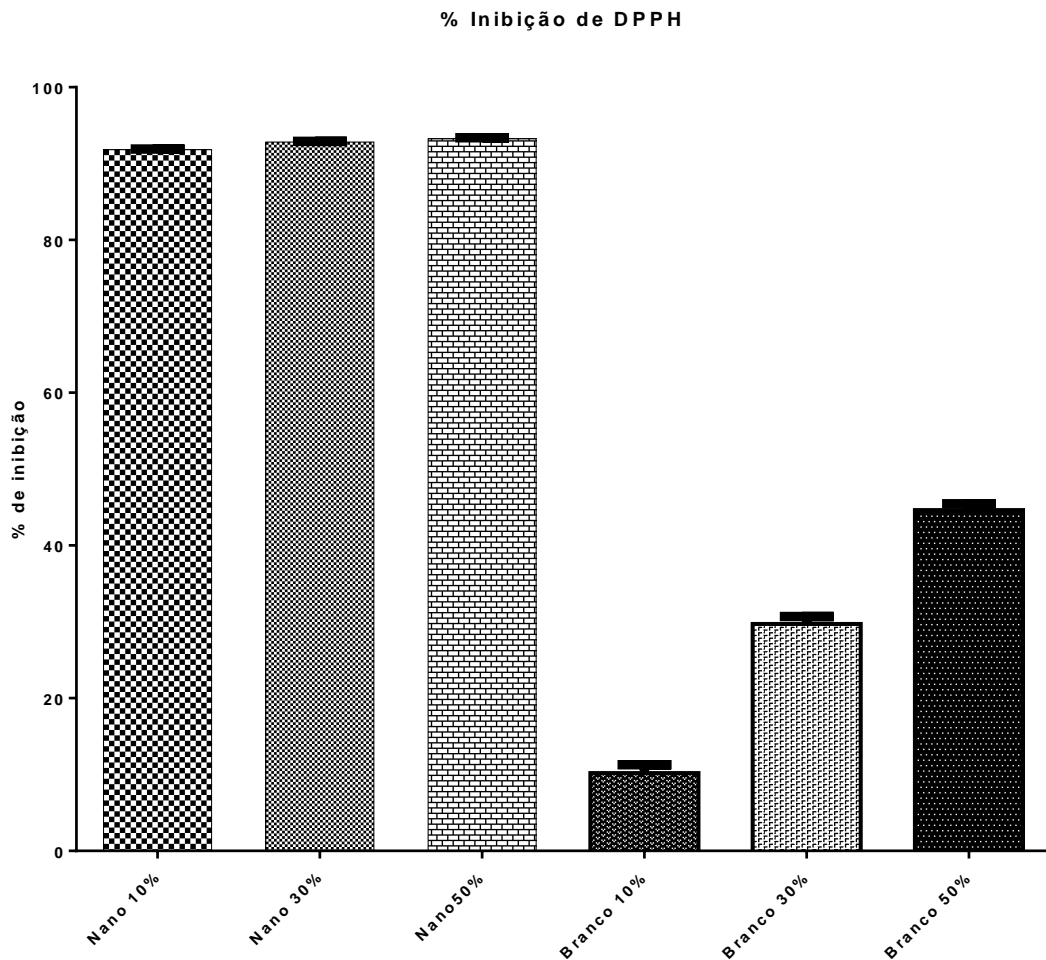


Figura 19. Percentual de inibição do radical DPPH das amostras de nanoemulsão e branco em 10%, 30% e 50%.

A formulação apresentou uma atividade antioxidante significativa, em relação ao seu branco, que continha os antioxidantes necessários para garantir a estabilidade do Óleo de Buriti e do extrato de Chá Verde presentes na formulação, demonstrando que as substâncias ativas, extrato aquoso de Chá Verde e Óleo de Buriti apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.

Futuramente, é interessante que sejam analisadas estas propriedades em culturas celulares de queratinócitos e em pele humana, para que possamos avaliar a eficácia da nanoemulsão quanto grau de penetração e as demais vantagens inerentes às formulações nanométricas. Em estudos realizados, as catequinas que constituem o Chá Verde demonstraram ação antioxidante em cultura celular de células HaCat (queratinócitos) expostas à radiação UVB, apresentando atividade de inibição da liberação de peróxido de hidrogênio intracelular e de stress oxidativo mediado por receptor de fator de crescimento epidermal. O mesmo foi observado na exposição de células HCat em radiação UVA (KATIAR, 2001).

6. CONCLUSÃO

Através do estudo realizado neste projeto podemos determinar uma metodologia e formulação estável para o desenvolvimento de uma nanoemulsão, contendo Óleo de Buriti e extrato de Chá Verde.

Concluiu-se que o valor de EHL requerido pelo Óleo de Buriti, utilizando os emulsionantes Oleth-20 E Laureth-2, é de 11,62.

O pH médio inicial da nanoemulsão é de 3,4 e após 28 dias de estabilidade acelerada de 3,72.

Este estudo nos evidenciou que o sistema não é aparentemente estável, quando preparado pela metodologia de inversão de fases utilizando temperaturas de emulsificação inferiores a $80\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Conclui-se também, que o emprego de soluções aquosas de extratos de Chá Verde são incompatíveis com o trietanolamina, e que extratos concentrados devem ter sua compatibilidade testadas, devido ao reduzido valor de pH..

Verificou-se que para este sistema emulsionante, e metodologia, o tamanho das gotículas da nanoemulsão podem variar de acordo com a quantidade de fase oleosa, e que o tamanho de partículas médio da nanoemulsão é de 135 nm e índice de polidispersão de 0,06, com valores de potencial zeta apresentando maior variação, porém com resultado médio de -25,3mV.

Conclui-se que a formulação apresenta potencial antioxidante *in vitro* estatisticamente significativo em relação ao seu branco. No entanto, mais estudos serão necessários mais testes *in vitro* e *in vivo*, para avaliar se a atividade antioxidante é específica do Óleo de Buriti, do extrato de Chá Verde, ou se há um efeito sinérgico entre eles. Contudo, esta nanoemulsão pode ser uma potencial matéria prima a ser empregada em formulações cosméticas, com função antioxidante.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Cartilha sobre nanotecnologia. Brasília, DF: ABDI, c2010. 58 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução RDC 79, de 31 de agosto de 200. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e adota a definição de produto cosmético. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 31 de agosto de 2000. N. 169-E Seção 1. P. 34.

ANVISA – **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2004.

ALMEIDA, S.P. et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA-CPAC**, 1998. 464p.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and diseases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 2, pp. 199-211, 1998.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2ª Ed.. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

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

BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2009.

BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. 4rd. ed. 162-164, New York: Marcel Dekker, 2014.

BECHER P. **Emulsions: theory and practice**. 3rd. Ed. New York: Oxford University Press, 2001.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v, 280, pp. 241-251, 2006.

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, pp.1-36, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERST, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technology**, v. 28, pp. 25-30, 1995.

BRYAN E. A., **Sistema Tegumetar**, Volume 4, Edição 2. São Paulo: Elsevier Brasil 2014.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advanced in Colloid and Interface Science**, Amsterdam vol. 107, pp. 125-155, 2004.

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, pp. 21-27, 2006.

COSTA, P.A.. Fatty acids, tocopherols and phytosterols characterization in north/northeast fruits in Brazil. Doctorate Thesis. 2007.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAÚJO, E.C.C.; LIMA, M.A.S.; MORAES, M.E.A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, 58:78-9, 2004.

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, pp. 153-157, 2001.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C.A. **Anatomia Humana: Sistêmica e Segmentar**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DESAI P, PATLOLLA RR, SINGH M. Interaction of nanoparticles and cell penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Mol Membr Biol.**, 27(7), pp. 247-259, 2010.

DINGLER, A.; GOHLA, S.; **J Microemulsion**, v19, p11. 2002

DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. **O que é nanobiotecnologia?** Atualidades e perspectivas. Campinas: Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica - Unicamp, 2004.

EPSTEIN, J.H.; LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. Biologicalefect of sunlight. In: **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect**. New York: Marcel Dekker, 1990.

ELASSER, M.S. ; LACK, C. D. ; CHOI, Y.T.; MIN, T.I.; VANDERHOFF, J. W.; FOWKES, F. M. Interfacial aspects of miniemulsions and miniemulsions polymers. **Colloids and Surfaces**, v. 12 (1-12), pp. 79-97, 1984.

ESQUENA, J.; SOLANS, C. Influence of HLB parameter of nonionic surfactants on normal and reversed-phase thin layer chromatography. **Colloids and Surfaces**, v. 189, pp. 85-92, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª. Ed. Livro 1, parte I - Generalidades e métodos de análise. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª. Ed. Métodos biológicos, ensaios biológicos e microbiológicos. p. 273. São Paulo: Atheneu, 2010.

Farmacopéia Brasileira, quinta edição, página 273, 2010.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces**, v. 251, pp. 53-58, 2004.

FIORINI, R.N. et al. Short-term administration of (-)-epigallocatechin-gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. **Liver Transplant**, v.11, n.3, pp. 298-308, 2005.

FISHER, G.J.; WANG, Z-Q.; DATTA, S.C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 337, pp. 1419-1428, 1997.

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 et al (eds). Tóquio: University of Tóquio Press, 1974.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em Farmácia**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2003.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS C.. Formulation of Nanoemulsions by Low Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v 17, pp. 2076 – 2083, 2001.

FÖSTER, T., VON RYBINSKI, W.; WADLE, A. Influence of microemulsions phases on the preparation of fine- disperse emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 58, pp. 119-149, 1995.

FREI, B.; HIGDON, V. Atioxidante activity of Tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **American Society for nutritional Sciences**, Bethesada, pp. 3275S-3284S, 2003.

FRONZA, T.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em Direção ao Estabelecimento de Marcos Regulatórios**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 19, pp. 56-72, 2003.

GARCIA-QUEIROZ, A.; MOREIRA, S.G.C.; DE MORAIS, A.V.; SILVA, A.S.; DA ROCHA, G.N.; ALCANTARA, P. Physical and chemical analysis of dielectric properties and differential scanning calorimetry techniques on Buritioil. **Instrumental Scientific Technology** 31, pp. 93–101, 2003.

GODÓI, A.A.; ISHIKAWA, B.B.; PORTO, K.R.A.; ROEL, A.R.; XAVIER, P.C.X.; YANO, M. Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de *Urera aurantiaca*. **Rev Bras Farm.** 92(3), pp. 198-202, 2011.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, pp. 311-326. 1949.

GRUIJL, F. R.; VAN KRANEN, H. L.; MULLENDERS, L. H. F. UV induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 63, pp. 19-27, 2001.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D.R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C.; LIMA, L.M.; GIANNELLA NETO, D.; SUSTOVICH, C.; LOPES, N.P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.3, pp. 717-721, 2009.

HALDER, A. et al. Black tea (*Camellia sinensis*) as a hemopreventive agent in oral precancerous lesions. **Journal of Environmental Pathology e Toxicological Oncology**, v.24, n.2, p.141-4, 2005.

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

HEATH, J. W; YOUNG, B. Pele. In: YOUNG, B.; HEATH, J. W; **Histologia funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2001.

HECK, D. E.; GERECKE, D. R.; VETRANO, A. M.; LASKIN, J. D.; **Toxicol. Appl. Pharmacol.** n195, pg 288, 2004.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malonaldehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam v. 305, pp. 75-80, 2001.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH; *Q1A2*, **Guidance for Industry - Stability Testing of New Drug Substances and Products**, Revision 2, November, 2003.

INTERNATIONAL STANDAR ORGANIZATION, **ISO 14502-1** – “Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent”, 2005.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TARDOS, T.F. DEDEREN, C.; GARCIA M. J.; AZEMAR, N. SOLANS, C.; Formation and stability of nanoemulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Lanmuir**, v. 18 pp. 26-30, 2002.

KATAGI, S.; KIMURA, Y.; ADACHI, S. Continuous preparation of O/W nano-emulsion by the treatment of coarse emulsion under subcritical water conditions. **LWT – Food Science Technology**, v. 40, pp. 1376-1380, 2007.

KATIYAR, S.K.; CHALLA, A.; McCORMICK, T.S; COOPER, K.D.; MUKHTAR, H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. **Carcinogenesis**, v.20, pp.2117-2124, 1999.

KATIYAR, S.K.; PEREZ, H.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidinedimers in DNA. **Clinical Cancer Research**, v.6, pp.3864-3869, 2000.

KATIYAR SK, AFAQ F, AZIZUDDIN K, ET al. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Toxicol Appl Pharmacol.**,176, 107-110, 2001.

KAUR, I. P.; KAPILA, M; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v.6, n. 4, pp. 271 – 88, 2007.

KHARE, N. KHARE, P., YADAV G. Recent Advances in Anti Aging – A review. **Global Journal of Pharmacology**, n.9, vol. 3, pp. 267-271, 2015.

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**, pp. 1-8, 2007.

KIRCHOFF, V. W. J. H., **Ozônio e radiação UVB**. São José dos Campos: Transtec, 1995.

LACHMAN, L; LIERBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. 3 ed. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986.

LANDFESTER, K.; EISENBLATERM J.; ROTHE R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. **JCT Research** v. 65, pp.65-68, 2004.

LEE, V. H.L. Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Rewiws.**, v. 56, pp. 1527-1528, 2004.

LEONARDI, G. R. Cosmetologia aplicada. **Medfarma** 1º Ed., pp. 56-57, 2000.

LIANG, Y. et al. Comparison of chemical compositions of Ilex latifolia Thumb and Camellia sinensis L. **Food Chemistry**, v.75, n.3, pp.339-43, 2001.

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

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

MARUNO, M., Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. USP, Ribeirão Preto, 2009.

MARTINI, F.H., TIMMONS, M. J., TALLITSCH R. B. **Anatomia Humana**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), 15, pp. 42-53, 2003.

MCNULTY, H., JACOB, R.F., MASON, R.P., Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. **American Journal of Cardiology** 101, pp 20–29, 2008.

MENDONÇA, V.L.M. Proteção Solar X Fator de Proteção. **Revista Racine**, 5:14, 1996.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, S1, pp. S3-S17, 2002.

MEYBEC, A. Objective methods for the the evaluation of sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, 98, pp. 51-60, 1983.

MILLER, C.A. **Emulsions and Emulsion Stability** Boca Raton, Flórida: Taylor and Francis, 2006.

MORALES, D.; GUITTERREZ, J. M. ; GARCIA-GARCIA, M.J. SOLANS, C. A study of the relation between biocontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir**, v. 19, pp. 7196 – 7200, 2003.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Method**. 65, pp. 55–63, 1983.

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

MURUHAN S, SELVARAJ S, VISWANATHAN PK. *In vitro* antioxidant activities of *Solanum surattense* leaf extract. **Asian Pac J Trop Biomed**, pp. 28–34. 2013.

MUTHUSAMY, V.; PIVA, T. J. The UV response of the skin: a review of MAPK, NFkB and TNF α signal transduction pathways. **Archives of Dermatological Research**, v. 32, n.1, pp. 5-17, 2010.

NAKAJIMA, H.; TOMOMASA, S.; OKABE, M. Proceedings of the First World Congress on Emulsions, Paris, p. 1-11-162, 1993.

NAG-CHAUDHURI, A.K. et al. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (Sikkim variety). **Pharmacological Research**, v.51, n.2, pp.169-175, 2005.

NASH, J.F.; MATTS, P.J.; ERTEL, K.D. Maintenance of healthy skin: cleansing, moisturization, and ultraviolet protection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 6, n. 1, pp. 7-11, 2007.

NORVAL, M., Effects of solar radiation on the human immune system. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 63, pp. 28-40, 2001.

ODLAND, J. Laser activation spectrum of reduced excitability In nerve cels. **Brain Research**, pp. 436- 420, 1981.

OFFORD, E. A.; GAUTIER, J. C.; AVANTI, O.; SCALETTA, C.; RUNGE, F.; KRAMER, K.; APPLGATE, L. A. Photoprotective potential of lycopene, - carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA irradiated human skin fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, San Diego, v. 32, n. 12, pp. 1293 – 1303, 2002.

OLIVEIRA, B. R., Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões de *Carapaguianensis e Copaiferasp.* e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado – USP, Ribeirão Preto, 2008.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M-C.; CHIVOT, M. **Estética cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998.

PORRAS, M. SOLANS, C. GONZÁLEZ, ; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Studies of formation of W/O nanoemulsions. **Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, pp. 115-118, 2004.

RENZING, J.; HANSEN, S.; LANE, D. P.; J. **Cell Sci.**, n 109, pg 1105, 1996.

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

ROSS D, MOLDEUS P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press;151-170, 1991

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, pp.5062-5072, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ- JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D.; Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico nº 127, Embrapa**, Fortaleza, 2007.

RUBIN, E. RADKE, C. J. Dynamic interfacial tension minima in finite systems. **Chemical Engineering Science**, v. 35, pp. 1129-1138, 1980.

SAJJADI, S.; ZEFRA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with non-ionic surfactant pair sorbitanmonolaurate/polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Span20/Tween 20). **Colloids and Surfaces**, v. 218, pp. 241 – 254, 2003.

SALVADOR, A.; HENRIQUES, M. D.; Determination of butyl methoxybenzoylmethane, benzophenone – 3, octyldimethyl PABA and octylmethoxycinnamate in lipstick. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 25, pp. 97-102, 2004.

SCHMITZ, W. et al. O. O Chá Verde e suas ações como quimioprotetor. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 26, n. 2, pp.119-130, 2005.

SENGER, A. E.V.; SCHWANKE, C.H. A.; GOTTLIEB, M.G.V. Chá Verde (*Camelliasinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, pp. 292-300, 2010.

SHETTY, P. K.; VENUVANKA, V.; CHETHAN, G. H.; LIGADE, V. S. Development and evaluation of sunscreen creams containing Morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, pp. 6477-6491, 2015.

SHINODA, K.; FRIBER, S. *Emulsions and Solubilization*, New York: Wiley, 1986.

SHINODA K .SAITO, H. The effect of phase volume on phase inversion temperature of emulsions stabilized with non ionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 25, pp. 429-431, 1968.

SMITH, E. H.; MALBACH, H. I.; SUBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker, 2000.

SOLANS, C. ESQUENA, J.; FORGIARINI, A. USÓN, A.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N. N., In: MITTAL, K.L.; SHAH, D.O. (Eds), *Adsorption and Aggregation of surfactants in solution*, new York, Marcel Dekker, v. 19, p. 525, 2003.

SONNEVILLE-AUBRUN O.; SIMONNET J. T. ; L'ALLORET F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advanced in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, May, 20; 108-109: 145-9, 2004.

STAHL, W., SIES, H., Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiology* 15, 291–296, 2002.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANIS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, pp. 303-318, 2004.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, pp. 107-163, 1998.

THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London: Royal Society, 2004.

TOLEDO, A. M. F. Pele e anexos. In: MAIO, M. **Tratado de Medicina Estética**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004.

TORTORA, G. J., DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROTTA, M.; GULLARATE, M.; PATTARINO, F.; MOREL, S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drugs nanosuspensions. **Journal of Controlled Release**, v. 79, pp. 119-128, 2001.

TURCHETTI, B. et al. In vitro antimycotic activity of some plant extracts towards yeast and yeastlike strains. **Phytotherapy Research**, v.19, n.1, pp.44-9, 2005.

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

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

ZANATTA, C.F. et al. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with buriti oil (*Mauritiaflexuosa*) assessed by the neutral red release test. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, pp.2776-2781, 2008.

ZANATTA, C.F. et al. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritiaflexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, pp.70-75, 2010.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H.-H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema: an in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 307, n. 232, 2006..

YAM, T.S. et al. Microbiological activity of whole and fractioned crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. **FEMS Microbiology Letters**, v.152, n.1, pp.169-74, 1997.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. Productosprotectores solares, bronceadores, antieimaduras solares. In: **Cosmetologia de Harry**. Madrid, Diaz dos Santos, 1990.

WORLD NANOTECHNOLOGY MARKET. **An industry update**. RNCOS, pp.1-60, 2005.

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

ANEXO 1




• HEALTH AND PERSONAL CARE •

Produto: RAIN FOREST RF3810R
Descrição: Óleo de Buriti Refinado
INCI name (CTFA): *Mauritia flexuosa fruit oil*
INCI name (EU labelling): *Mauritia flexuosa*
Código: RF3810R
Lote: 05143810R
Fabricação: May/14
Validade: May/15

Página 1/1
Data: 29/05/2014

CERTIFICADO DE ANÁLISES

ANÁLISES	UNIDADES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aparência	-	Líquido viscoso	De acordo
Odor	-	Característico	De acordo
Cor	-	Avermelhado	De acordo
Ponto de Fusão	°C	-	-
Densidade (20°C)	g/cm ³	0,800 – 0,980	0,900
Índice de Acidez (% ac. oleico)	%	Máx.2	1,85
Índice de Peróxido	meq/1000g	Máx.10	2,69
Índice de Iodo	g ₂ /100g	65 – 95	72,54
Índice de Saponificação	mgKOH/g	150 – 210	188,83

*Condições de Armazenagem: Armazenar em local fresco e arejado ao abrigo da luz, à temperatura constante preferencialmente ambiente.
 Trata-se de um produto natural, portanto pode sofrer variação de suas características físico-químicas se não cumpridas as orientações para armazenagem, reduzindo shelf-life do produto.

Químico Responsável:



Renato Souza - CRQ n.: 06300221 - VI Região

ANEXO 2



ActivePharmaceutica

CERTIFICADO DE ANÁLISES N° 49/14

INSUMO: **GREEN TEA 95%**NOME BOTÂNICO: *Camellia sinensis*

PARTE UTILIZADA: Folhas

LOTE: 20140525

CAS: 84650-60-2

ORIGEM: China

FABRICAÇÃO: 25/05/2014

VALIDADE: 24/05/2016

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Descrição	Pó fino marrom com odor característico	Conforme
Teor:		
Polifenóis (UV)	≥ 95.0%	96.21%
EGCG (HPLC)	≥ 45.0%	46,14%
Cafeína (HPLC)	≥ 3.0%	3.13%
Tamanho de partícula	90% deve passar em malha 80	Conforme
Solvente extração	Álcool	Conforme
Perda por dessecação	≤ 5.0%	3.11 %
Cinzas	≤ 5.0%	3.12%
<i>Metais pesados:</i>	< 20 ppm	Conforme
Arsênico	< 2 ppm	Conforme
Resíduo Solvente:	Eur. Pharm.	Conforme
<i>Microbiológico :</i>		
Contagem Total	< 10000 UFC/g	3.200 UFC/g
Bolores e Leveduras	< 10000 UFC/g	210 UFC/g
<i>E. Coli</i>	Negativo	Negativo
<i>Salmonella</i>	Negativo	Negativo

Referências: FABRICANTE

Parecer: Insumo Farmacêutico conforme especificações.

Armazenamento: Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade. Não conservar em geladeira.

Responsável Técnica: Francielly Grassi – CRF/SC 3557 _____

São José, 17 de setembro de 2014



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad